



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Gabriel Zazeri

Síntese de zeólita Mordenita (MOR) utilizando radiação de
micro-ondas e sua aplicação como potencial agente
hemostático coagulante.

São José do Rio Preto
2017

Gabriel Zazeri

Síntese de zeólita Mordenita (MOR) utilizando radiação de micro-ondas e sua aplicação como potencial agente hemostático coagulante.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc.134007/2015-8

Orientador: Prof. Dr. Jose Geraldo Nery

São José do Rio Preto
2017

Zazeri, Gabriel

Síntese de zeólita Mordenita (MOR) utilizando radiação de micro-ondas e sua aplicação como potencial agente hemostático coagulante./ Gabriel Zazeri. - São José do Rio Preto, 2017.

97 f. : il.

Orientador: Jose Geraldo Nery

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica. 2. Biologia molecular. 3. Microondas. 4. Mordenita. 5. Coagulantes. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 577.3

Gabriel Zazeri

Síntese de zeólita Mordenita (MOR) utilizando radiação de micro-ondas e sua aplicação como potencial agente hemostático coagulante.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc.134007/2015-8

Orientador: Prof. Dr. Jose Geraldo Nery

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Jose Geraldo Nery
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Regina Célia Galvão Frem
UNESP – Araraquara

Prof. Dr. Elso Drigo Filho
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
19 de abril de 2017

Agradecimentos

Neste tópico do meu trabalho de pesquisa gostaria de agradecer certas pessoas e entes não físicos por terem contribuído para a realização desta pesquisa. .

Primeiramente agradeço a Deus por me conduzir de forma correta para que eu não cometesse erros que fizessem com que eu recuasse diante dos meus objetivos, posteriormente agradeço aos meus pais, Márcia Rodrigues e Luiz Augusto Zazeri, por todo amor incondicional e força fornecida diante dos momentos críticos de minha formação e por estado em todos as situações fazendo parte integral da minha vida sempre dispostos a ajudarem com um sorriso no rosto.

Agradeço a minha namorada, Ana Paula R. Povinelli, por me acompanhar ao longo de toda a minha formação e ter enriquecido esta pesquisa com suas discussões científicas, por ter estado ao meu lado em todos os momentos me apoiando e amadurecendo junto comigo.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Geraldo Nery por ter me dado a oportunidade de realizar este projeto, além do professor, eu gostaria de mencionar a Me. Juliana Bergamasco Laurenti e o Dr. Alex Silva de Paula por terem fornecido ajuda durante a realização deste trabalho. Gostaria de deixar meus agradecimentos a todos os meus companheiros de trabalho do grupo LACET e gostaria de agradecer à todos os meus amigos que estiverem ao meu lado durante este período.

Agradeço à Prof^a.Dr^a Marcia Cabrera por oferecer espaço no seu laboratório para a realização dos experimentos de potencial Zeta, ao prof. Dr. Sebastião Taboga por permitir a realização dos experimentos de microscopia de contraste de fase, ao departamento de materiais da ufscar (DEMA) por permitir a realização dos experimentos de microscopia eletrônica e a seção técnica de saúde em especial à enfermeira Paula Menezes do Ibilce pela ajuda para que fossem feitos os experimentos de coagulação.

Por fim agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

“Um cientista que também é um ser humano não deve descansar enquanto o conhecimento que pode reduzir o sofrimento repousa em uma estante”

Albert Sabin

Resumo

Zeólitas são materiais policristalinos constituídos de aluminossilicatos que possuem sistemas de poros e cavidades, alta área superficial e carga negativa. Devido a essas propriedades físico-químicas, esses materiais podem ser utilizados como trocadores iônicos, peneiras moleculares, catalisadores heterogêneos e agentes hemostáticos coagulantes. No que diz respeito a aplicação desses materiais como agentes hemostáticos coagulantes, as propriedades físico-químicas descritas acima oferecem um ambiente favorável para que o processo de coagulação ocorra mais rapidamente, uma vez que as cargas negativas presentes na estrutura das zeólitas induzem o início da via intrínseca da cascata de coagulação, este fenômeno é conhecido como “glass effect”. Além disso, a alta área superficial facilita a adsorção de moléculas de água e como consequência, as proteínas e fatores coagulantes ficam concentrados facilitando o processo de formação do coágulo.

O uso de nanozeólitas das famílias FAU e LTA como agente coagulante já foi reportado na literatura, no entanto não existem relatos de aplicação da nanozeólita MOR para tal finalidade. Sendo assim, um dos objetivos desta pesquisa foi avaliar o potencial coagulante desta zeólita. Para tanto, a síntese da nanozeólita é um processo fundamental e o desafio desta pesquisa foi reduzir o tempo de síntese e a escala do material utilizando a radiação de micro-ondas sem perder a cristalinidade e a pureza de fase.

Para este estudo, a síntese da zeólita foi realizada seguindo a composição molar: $1\text{Al}_2\text{O}_3$: 30SiO_2 : $6\text{Na}_2\text{O}$: $780\text{H}_2\text{O}$. O método utilizado para a síntese foi a técnica sol-gel e as fontes de aquecimento foram a convencional e a radiação de micro-ondas. O material sintetizado foi caracterizado pelas técnicas de difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de alta transmissão (MET), potencial Zeta, BET, Microscopia de

contraste de fase e os parâmetros de coagulação sanguínea foram testados utilizando um tromboelastógrafo (TEG).

Os padrões de difrações das zeólitas revelaram que foram necessários 4 dias de síntese utilizando a fonte de aquecimento convencional, enquanto que foram necessárias apenas 5 horas de síntese quando utilizado a radiação de micro-ondas. Os parâmetros de coagulação sanguínea obtidos pelo TEG revelaram que o sangue humano sem adição do material zeolítico inicia a formação do coágulo com 9,8 minutos, por outro lado, quando adicionado material zeolítico no sangue este parâmetro reduziu para 3,8 minutos. Além da redução de tempo para a formação de coágulo, os parâmetros de elasticidade da rede de fibrina e a geração de trombina também foram otimizados quando o material foi adicionado ao sangue.

Palavras-chave: Biofísica. Micro-ondas. Mordenita. Coagulantes.

Abstract

Zeolites are aluminosilicate polycrystalline materials with properties such as nanosized pores, channels and large surface area. Due to these physicochemical properties, zeolitic materials can be used as ion exchangers, molecular sieves, heterogenous catalysts and hemostatic coagulation agent. Concerning the application of zeolites as hemostatic agentes, mordenite zeolite has physicochemical properties that offer a favorable environment that makes coagulation more efficient, such as negative charges, that induce the initialization of intrinsic via of clot cascade, this phenomenon is known as glass effect. Furthermore, the high surface area makes the adsorption of water molecules more efficient which concentrates proteins and coagulant factors, thus accelerating the formation of clot.

The application of nanozeolite FAU as hemostatic coagulation agent has been reported in the literature, nevertheless as far as it's concerned, nanozeolite MOR hasn't been reported for this application. Therefore one of this research objectives was evaluate the hemostatic coagulation potential of nanozeolite MOR and to reach this objective, the synthesis of the material was fundamental. However the challenge of this research was decrease the synthesis time and decrease the size of material using microwave radiation without lose the cristalinity and phase purity.

For this study, mordenite zeolite was synthetized with the following gel composition: $1\text{Al}_2\text{O}_3$: 30SiO_2 : $6\text{Na}_2\text{O}$: $780\text{H}_2\text{O}$. The method used for the synthesis was sol-gel technique and the heat sources were both hidrothermal and microwave heating. The synthetized material was characterized by X-rays diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), High resolution transmission eléctron microscopy (HRTEM), Zeta

potential, BET and Phase contrast microscopy. Thromboelastography (TEG) test in vitro was employed to determine the clotting efficiency of the made zeolite when it is in contact with blood. X-Rays diffraction patterns showed that synthesis employing conventional heating took 4 days to yield mordenite zeolite whereas employing microwave heating this synthesis time was decreased to 5 hours. The TEG profile and clotting parameters revealed that without the addition of zeolites, human blood begins to clot at about 9,8 minutes. Adding zeolites to the human blood, regardless of heating source employed, has decreased the clotting time to 3,8 minutes. Elastic properties of the formed clots by using mordenite zeolite as hemostatic agents and thrombin generation were also improved.

Keywords: Biophysics. Microwave. Mordenite. Coagulants.

Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração de alguns planos da estrutura cristalina da Mordenita.	18
Figura 2: Unidades primárias de construção.	19
Figura 3: As 16 unidades secundárias de construção propostas por Meir (1968). Essas unidades consistem de 4 a 16 átomos T formando diferentes tipos de redes zeolíticas. 20	
Figura 4: Unidades poliédricas de construção. A= 4 anéis, B= 6 anéis, C= gaiola δ , D= gaiola 4-4, E= 8 anéis, F= gaiola ϵ , G= gaiola γ , H= gaiola 6-6, I= gaiola sodalítica, J= gaiola levina, K= gaiola chabazita, L= gaiola α , M= gaiola eronita, N= supergaiola faujasita.....	21
Figura 5: Formação estrutural das zeólitas A e Y.....	22
Figura 6: Esquema da cascata de coagulação (via extrínseca, via intrínseca e via comum).....	29
Figura 7: Esquema de outro modelo da cascata de coagulação (O modelo celular).	32
Figura 8: Faixa espectral dos possíveis comprimentos de onda e frequência das ondas eletromagnéticas.	37
Figura 9- Orientação dos dipolos presentes na amostra provenientes da interação com as ondas eletromagnéticas.....	38
Figura 10: Esquema de produção de raio-x.....	39
Figura 11: Comprimentos de onda liberado segundo o decaimento de elétrons da nuvem eletrônica do átomo.	39
Figura 12: Exemplo de estrutura cristalina do NaCl, onde as esferas em preto são os modelos dos átomos de Cl e as esferas azul são os modelos do átomo de Na.	40
Figura 13: Exemplo ilustrativo da lei de Bragg referente aos planos cristalinos.	41
Figura 14: Exemplo de Difratograma.	42
Figura 15: Planos primitivos ou células unitárias.....	43
Figura 16: Redes primitivas e redes de Bravais.	43
Figura 17: Tipos de Redes primitivas.	44
Figura 18: Modelo ilustrativo de um cristal na dedução da equação de Scherrer.	45
Figura 19: Curvas de difração em cristal: (a) caso real, (b) caso hipotético.	46
Figura 20: Exemplo de microscópio Eletrônico.	49
Figura 21: Profundidade de penetração do MEV.....	50
Figura 22: Imagens de superfície geradas pelo MEV, onde na região da esquerda tem-se a superfície de um ácaro e na região da direita tem-se um estômato presente em um vegetal.....	51
Figura 23: Imagem de contraste de número atômico.....	52
Figura 24: Análise de EDX.....	53
Figura 25: Exemplos de padrões de difrações de elétrons (A) de monocristais (B) de policristais.....	54
Figura 26: Modelo de difração de elétrons em policristais.	54
Figura 27: Ilustração de um modelo de tromboelastógrafo.....	56
Figura 28: Representação gráfica do tromboelastograma.	58
Figura 29: Oscilação da sonda do tromboelastógrafo.	58
Figura 30: Padrões de difração das amostras de Mordenita sintetizadas sob radiação de micro-ondas e sem adição de sementes com tempos de sínteses variados.....	63
Figura 31: Padrões de difração das amostras de Mordenita sintetizadas sob radiação de micro-ondas e sem adição de sementes com tempos de envelhecimento e sínteses variados.....	64
Figura 32: Padrão de difração da zeólita sintetizada sob aquecimento convencional....	66
Figura 33: Modelo de uma Rede ortorrômbica.	68

Figura 34: Padrões de difração para as zeólitas sintetizadas sob radiação de micro-ondas.....	69
Figura 35: Micrografia da semente de Mordenita.	70
Figura 36: Ampliações da superfície da Mordenita da figura 36.	71
Figura 37: EDX da Semente de Mordenita.	72
Figura 38: Micrografia da zeólita sintetizada com 5 horas sob radiação de micro-ondas.	73
Figura 39: (A)Região de cristalização das zeólitas sobre a semente e (B) Estilhas de cristais de Mordenita.	73
Figura 40: Micrografia de zeólitas formadas sobre a superfície da semente com 7 horas de síntese sob radiação de micro-ondas.....	74
Figura 41: Micrografia de zeólitas formadas sobre a superfície da semente com 9 horas de síntese sob radiação de micro-ondas.....	75
Figura 42: Ampliações da micrografia da Figura 41 com magnitudes de ampliações de (A) 20000X (B) 50000X (C)100000X.	76
Figura 43: Distribuição de tamanhos da zeólita Mordenita sintetizada por 9 horas sob radiação de micro-ondas.....	77
Figura 44: EDX da zeólita sintetizada com 9 horas sob radiação de micro-ondas.	77
Figura 45: Padrão de difração de elétrons da zeólita sintetizada com 9 horas sob radiação de micro-ondas.....	78
Figura 46: Padrão de difração com suas respectivas indexações.	79
Figura 47: Gráfico de Adsorção de moléculas de N ₂ das zeólitas Mordenita.	81
Figura 48: Potencial Zeta das zeólitas Mordenita.	82
Figura 49: Tromboelastogramas de amostras de sangue com adição de zeólitas (curvas em preto, verde, rosa e marrom) e sem adição do material zeolítico (curva em azul). 84	
Figura 50: Micrografia de contraste de fase de amostra de sangue sem adição de zeólita.	88
Figura 51: Micrografia de contraste de fase de amostra de sangue junto da zeólita antes da coagulação.	89
Figura 52: Micrografia de contraste de fase do coágulo com a zeólita em seu interior. 90	
Figura 53: Micrografia de contraste de fase evidenciando um coágulo.	91

Lista de tabelas

Tabela 1: Exemplos de alguns agentes hemostáticos juntamente com seus princípios ativos, mecanismos de ação, forma farmacêutica e laboratório responsável.	35
Tabela 2: Dados de 2θ e distância entre planos cristalinos da zeólita Mordenita sintetizada com aquecimento convencional.	67
Tabela 3: Parâmetros de célula unitária da semente Mordenita.	68
Tabela 4: Tabela com dados de BET das zeólitas Mordenita.	80
Tabela 5: Parâmetros R, K, ângulo α e MA dos experimentos de Tromboelastografia. .	85

Lista de siglas e abreviaturas

BET	Experimento que descreve a adsorção física de moléculas de gás sobre a superfície sólida.
CH_seed	Zeólita Mordenita sintetizada com aquecimento convencional.
DRX	Difração de raios-X.
FAU	Zeólita Faujasita
HMWK	Cininôgenio de alto peso molecular
FDA	Food and Drug Administration
IZA	International Zeolites Administration
LTA	Zeólita Linde type A (LTA)
MA	Amplitude máxima ou máxima amplitude
MET	Microscópio eletrônico de transmissão.
MEV	Microscopia eletrônica de varredura.
MH_1	Zeólita Mordenita sintetizada sob radiação de micro-ondas e com adição de sementes à 170°C por 5 horas.
MH_2	Zeólita Mordenita sintetizada sob radiação de micro-ondas e com adição de sementes à 170°C por 7 horas.
MH_3	Zeólita Mordenita sintetizada sob radiação de micro-ondas e com adição de sementes à 170°C por 9 horas.
MOR	Mordenita
SBU	Secondary building units
TAFI	Inibidor de fibrinólise ativado pela trombina
TEG	Tromboelastograma.
TF	Fator tecidual
TFPI	Inibidor proteico do fator tecidual

Sumário

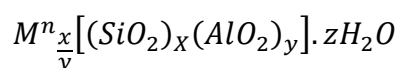
1.1	Introdução	16
1.2	Zéolitas e Nanozéolitas	16
1.2.1	Definição de Zeólitas.....	16
1.2.2	Propriedades das Zeólitas	18
1.2.3	Síntese das zeólitas e nanozéolitas.	23
1.2.4	Zeólitas como agentes hemostáticos coagulantes.....	24
1.2.5	Hemostasia	27
1.2.6	Cascata de coagulação	28
1.2.7	Modelo Celular	30
1.2.8	Agentes hemostáticos.	33
2.	Fundamentação Teórica	36
2.1	Aquecimento convencional e aquecimento por radiação na faixa do micro-ondas na síntese.	36
2.2	Técnicas Físico-Químicas para caracterização de materiais.....	38
2.2.1	Difração de Raios-X (DRX)	38
2.2.2	Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV) e Transmissão de alta resolução (MET).....	48
2.3	Tromboelastografia (TEG).....	55
3.	Procedimentos Experimentais.	58
3.1	Síntese da zeólita Mordenita utilizando fonte de calor convencional.	58
3.2	Síntese da zeólita Mordenita utilizando micro-ondas e sem semente.....	59
3.3	Síntese da zeólita Mordenita utilizando fonte de micro-ondas e sementes.	60
3.4	Caracterização da zeólita Mordenita por técnicas físico-químicas.....	60
4.	Resultados e discussões	62
4.1	Sínteses da zeólita Mordenita e análises dos padrões de difração	62
4.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão de alta resolução (MET) da zeólita Mordenita.	70
4.3	Análise de BET	79
4.4	Análise de Potencial Zeta.....	82
4.5	Estudos tromboelastográficos e micrografias de contraste de fase das zeólitas Mordenita.	83
5.	Conclusões.....	92
6.	Referências	94

1.1 Introdução

1.2 Zeólitas e Nanozeólitas

1.2.1 Definição de Zeólitas.

O termo zeólita vem do grego, e significa “pedra em ebulição”. Foi o nome dado pelo mineralogista Axel von Cronstedt (1756), a um mineral que liberava água, visivelmente, quando aquecido (Dyer, 1988; Araújo, 2013). A partir daí, muitos outros minerais similares a estes foram descobertos e a palavra zeólita passou a descrever uma família de minerais. Eles são comumente formados como o resultado da atividade vulcânica e também pela ação da água em ambientes próximos a vulcões (Dyer, 1988; Araújo, 2013). Historicamente, as zeólitas são definidas como aluminossilicatos que possuem estrutura tridimensional com ligações tetraédricas entre Silício-Oxigênio-Alumínio. Esta definição foi ampliada para incluir todos materiais caracterizados como materiais cristalinos de estrutura tetraédrica que contenha quatro Oxigênios circundado por cátions que podem ser Al, Si, P, Be, Zn, Mg, Co, B, etc. Esta estrutura contém canais e cavidades em que podem ser encontrado moléculas de água e cátions. As moléculas de água podem ser liberadas reversivelmente e os cátions usualmente substituídos pelo método de troca iônica. Os canais podem ter regiões microporosas e serem grandes o suficiente para acomodar determinadas moléculas, que podem ou não serem orgânicas (Dyer, 1988; Araújo, 2013). Os tetraedros TO_4 nas zeólitas são aproximadamente regulares, com ângulos T-O-T em torno dos átomos de Oxigênio no intervalo de 125° a 180° , sendo essa uma das razões da existência de tantas estruturas diferentes (Dyer, 1988; Araújo, 2013). A fórmula geral de uma zeólita à base de aluminossilicato pode ser escrita como:



Onde,

M = cátion de compensação, que pode ser alcalino ou alcalino terroso.

n = número de valência do cátion de compensação.

x = número de alumínio por fórmula unitária.

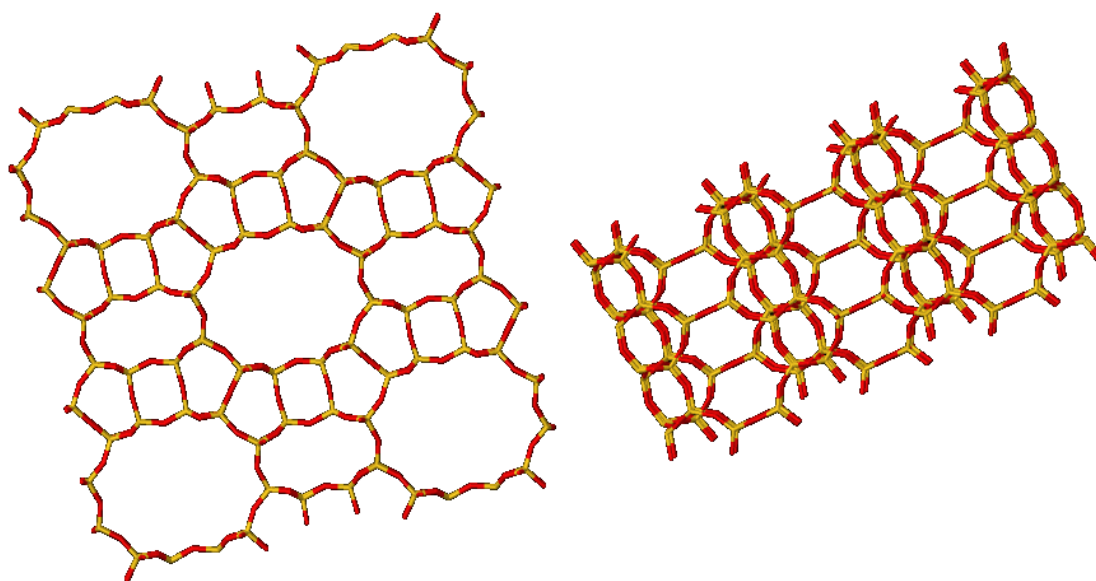
y = número de silício por fórmula unitária.

z = número de moléculas de água no sistema de cavidades.

A relação entre o átomo T (T=Al, Si) e o átomo de oxigênio é de 1:2 e a presença dos átomos de alumínio na rede induz a uma carga líquida negativa que pode ser variada, mudando a relação de Si/Al. Essa carga negativa é neutralizada pela presença dos cátions metálicos ou orgânicos. Os cátions extra-rede estão geralmente localizados nos canais e cavidades, podendo ser trocados pelo tratamento de troca iônica com uma solução salina em condições físico-químicas apropriadas.

O terceiro componente da fórmula geral é a fase adsorvida. Esta é dada geralmente como água na fórmula acima, porém, pode ser também um componente orgânico, como por exemplo, o benzeno. O componente aquoso ou orgânico desempenha um importante papel durante a síntese das zeólitas, tornando-se uma parte integrante da estrutura em desenvolvimento. A fase adsorvida pode ser removida da zeólita cristalina por aquecimento ou sob pressão reduzida sem destruição da estrutura zeolítica. Os três componentes da estrutura (esqueleto cristalino, cátions extra-rede de compensação e a fase adsorvida) são alvos de intenso interesse e desempenham um papel cujo grau de importância varia de acordo com a sua aplicação (Cundy e Cox, 2005; Araújo, 2013). A Figura 1 ilustra alguns planos da estrutura cristalina da Mordenita.

Figura 1: Ilustração de alguns planos da estrutura cristalina da Mordenita.



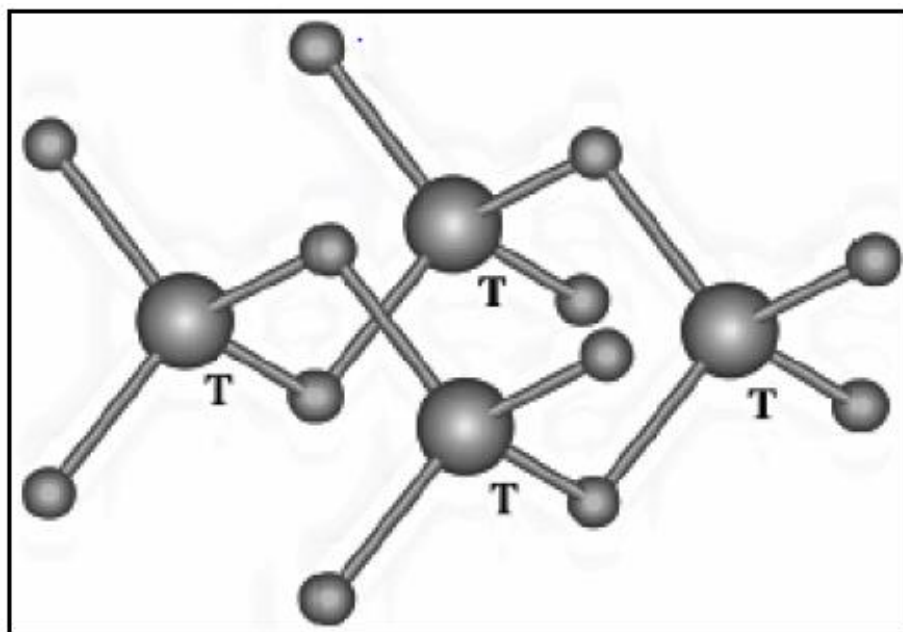
Fonte: Retirado da literatura (IZA).

1.2.2 Propriedades das Zeólitas

A maioria das propriedades físico-química das zeólitas estão diretamente relacionadas à sua estrutura cristalográfica, por esta razão, a caracterização e a descrição estrutural dos materiais zeolíticos são muito importantes.

Para explicar as estruturas cristalográficas das zeólitas, utilizam-se recursos didáticos como a divisão em subunidades com o intuito de descrevê-las e classificá-las, sendo que as mais simples são as chamadas unidades de construções primárias e secundárias, até chegar às unidades mais complexas, as unidades de construções poliédricas. Nas zeólitas, a unidade estrutural básica (unidade primária de construção) é a configuração tetraédrica de quatro átomos de oxigênio ao redor de um átomo central, geralmente Si e Al. A Figura 2 ilustra as unidades primárias representando os tetraedros TO_4 (onde T é um átomo com coordenação tetraédrica Si, Al, V, Cr, etc.) no qual cada átomo T possui quatro ligações, enquanto que o O possui apenas duas, formando assim uma rede tridimensional (Dyer, 1988).

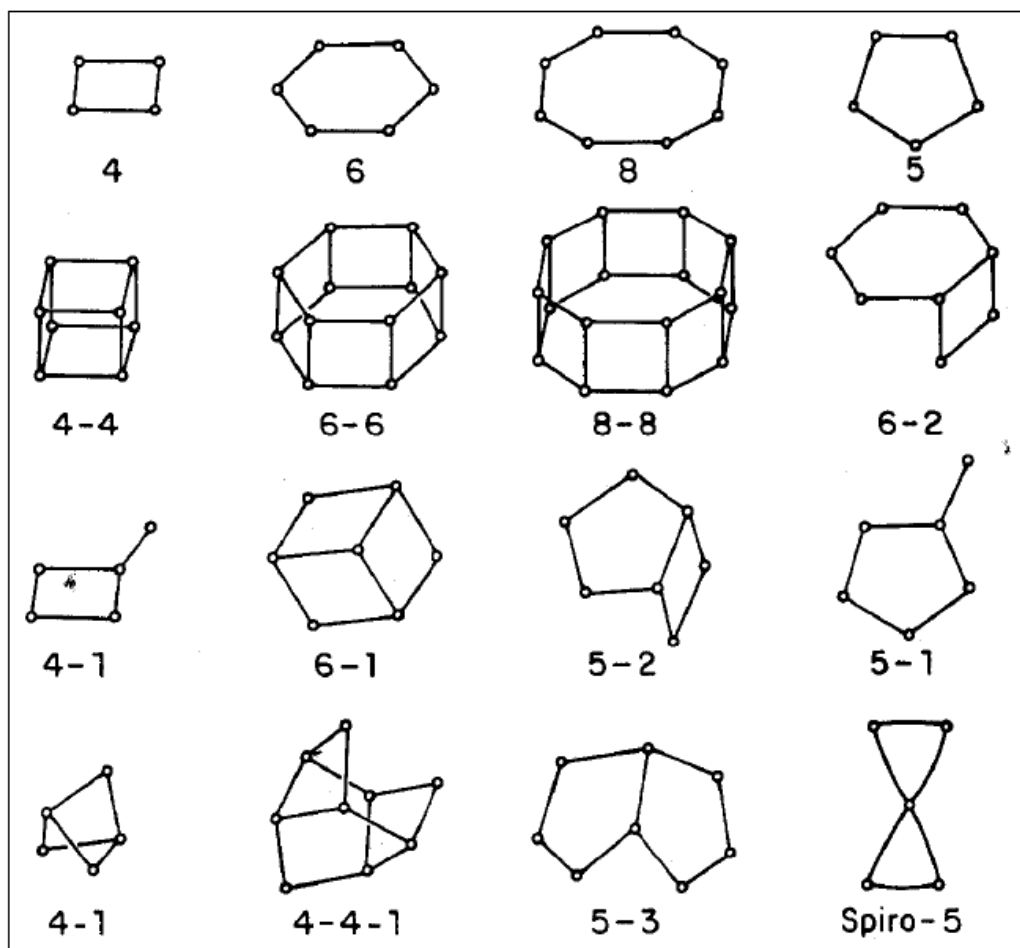
Figura 2: Unidades primárias de construção.



Fonte: Retirado da literatura (Araújo, 2013).

Embora seja difícil imaginar a construção de uma estrutura espacial contínua e complexa por intermédio da simples união de um pequeno número de tetraedros, a unidade de formação dessas estruturas pode ser facilmente visualizada por meio da existência de unidades secundárias de construção (Secondary Building Units ou SBU). As SBU são 16 unidades propostas por Meier (Dyer, 1988; Araújo, 2013) (1968) e são formadas pelo agrupamento das unidades primárias. Dessa forma os tetraedros formam unidades secundárias mais complexas que consistem de 4 a 16 átomos T e que podem ser ligadas para construir diferentes tipos de redes zeolíticas. Essas unidades estão representadas na Figura 3 e as ligações são ilustradas pelo desenho de linhas retas, que representam as ligações feitas pelo oxigênio conectando duas unidades tetraédricas (Dyer, 1988; Araújo, 2013).

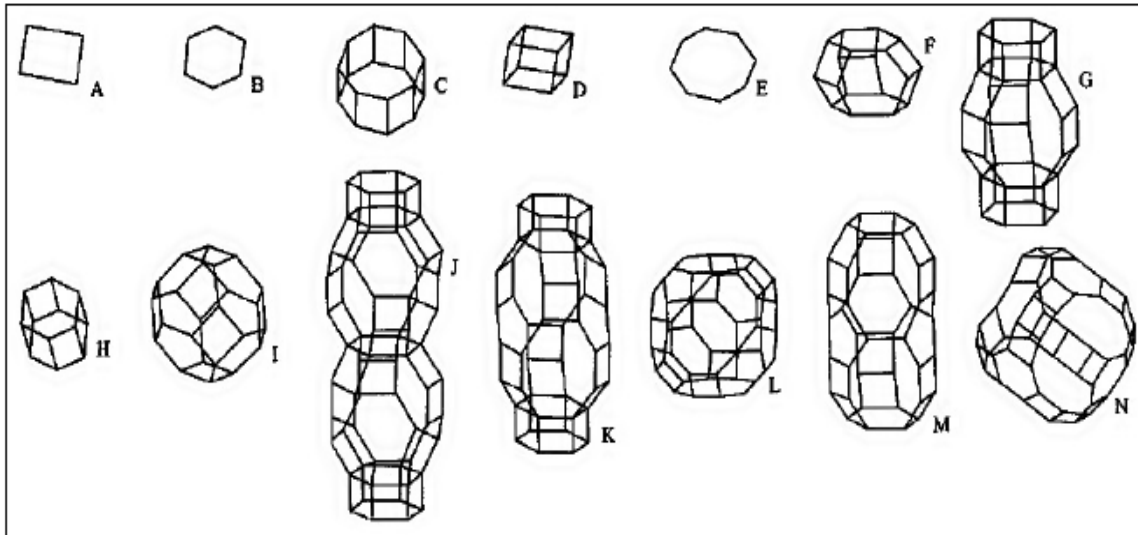
Figura 3: As 16 unidades secundárias de construção propostas por Meir (1968). Essas unidades consistem de 4 a 16 átomos T formando diferentes tipos de redes zeolíticas.



Fonte: Retirado da literatura (Smart e Moore, 2012).

A terceira e última ramificação é obtida pelas diferentes maneiras por quais as unidades secundárias de construção se unem para formar uma estrutura tridimensional, contendo canais e poros interconectados. Dessa forma, as estruturas das zeólitas podem ser mais facilmente visualizadas empregando-se o conceito de unidades poliédricas de construção (Dyer, 1988; Araújo, 2013). A Figura 4 mostra as diferentes unidades poliédricas de construção existentes.

Figura 4: Unidades poliédricas de construção. A= 4 anéis, B= 6 anéis, C= gaiola δ , D= gaiola 4-4, E= 8 anéis, F= gaiola ϵ , G= gaiola γ , H= gaiola 6-6, I= gaiola sodalítica, J= gaiola levina, K= gaiola chabazita, L= gaiola α , M= gaiola eronita, N= supergaiola faujasita.

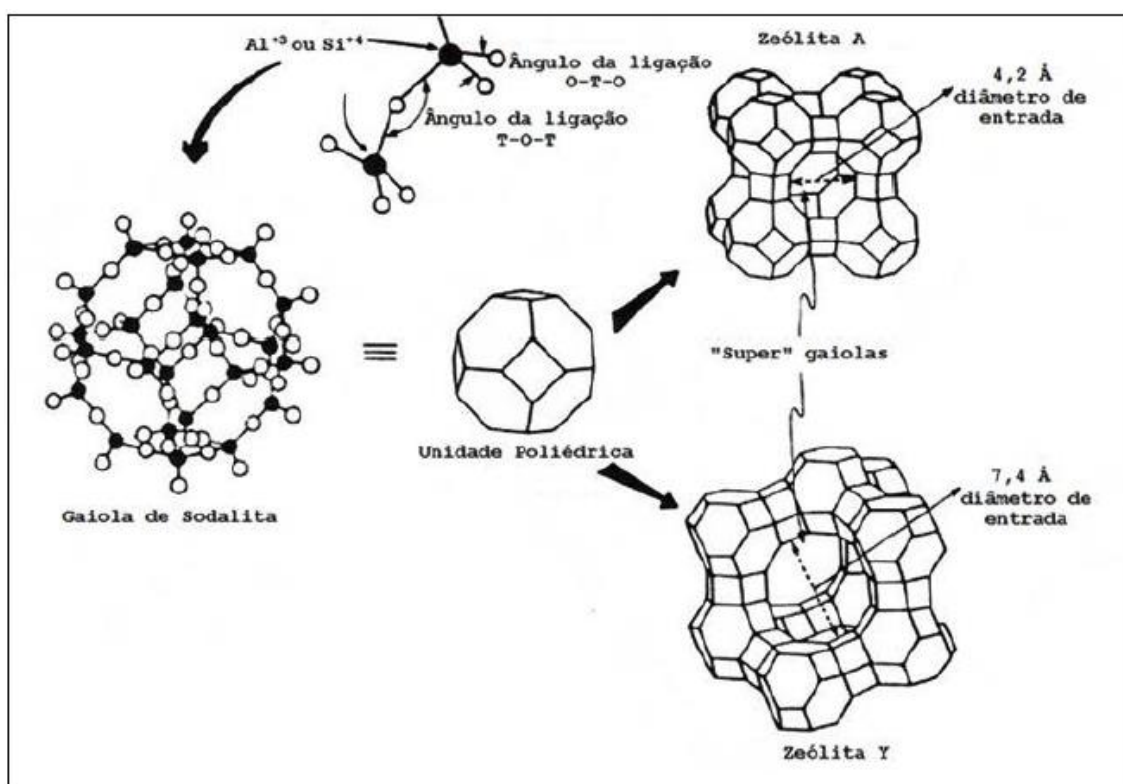


Fonte: Retirado da literatura (Smart e Moore, 2012).

Por exemplo, a gaiola sodalítica (Figura 4– I) consiste de um octaedro truncado formado por anéis de 4 a 6 tetraedros e que facilmente descreve a estrutura das zeólitas A e Faujasita, conforme mostrado na Figura 5. Embora a gaiola sodalítica possa ser usada para descrever tanto a zeólita A quanto a Y, podemos observar na Figura 5 que o diâmetro da cavidade de entrada é diferente em cada uma delas. A estrutura da zeólita Y possui um sistema de poros tridimensionais formado por doze átomos T com diâmetro de entrada de 7,4 Å, e apresenta dois sistemas de canais interconectados entre si, sendo um sistema formado pela união de supergaiolas α e outro sistema formado pela conexão alternada de sodalita e supergaiolas α . No caso da zeólita A, o sistema de poros tridimensionais é formado pela conexão alternada de gaiolas sodalíticas e gaiolas 4-4, resultando numa abertura de 8 átomos T com diâmetro de 4,2 Å (Dyer, 1988; Araújo, 2013).

As propriedades das zeólitas, tais como: troca iônica, poros cristalinos (que selecionam moléculas de dimensões diferentes), sítios ácidos e reservatórios iônicos para as reações catalisadas por metais, tem recebido extenso uso industrial. Sua aplicabilidade vai desde utilizações bioquímicas, agroindustriais, detergentes, melhorias no solo, indústria nuclear, armazenamento de energia, a indústria têxtil (Pavelic *et al.*, 2003).

Figura 5: Formação estrutural das zeólitas A e Y.



Fonte: Retirado da literatura (Smart e Moore, 2012).

Uma característica importante das zeólitas é sua capacidade de troca iônica. Sua estrutura negativamente carregada atrai cátions para que venham ocupar dentro dos seus poros e canais. Tal estrutura possui grandes espaços vazios, ou cargas, que podem acomodar cátions tais como Na^+ , K^+ , Br^+ e Ca^{2+} , e até mesmo moléculas relativamente grandes e grupos catiônicos. O processo de troca iônica é reversível, permitindo a adsorção de íons e moléculas, fazendo das zeólitas ferramentas úteis como filtros para

poeira, adsorção de toxinas e como peneiras moleculares. As zeólitas podem conter água como parte de sua estrutura entretanto, mesmo após a liberação da água por aquecimento a estrutura básica da zeólita permanece intacta.

1.2.3 Síntese das zeólitas e nanozeólitas.

Uma síntese típica de zeólita pode ser realizada pelo processo hidrotérmico podendo ser submetida ao aquecimento convencional ou exposta a radiação de micro-ondas. Os reagentes utilizados são uma fonte de silício, uma fonte de alumínio, um agente mineralizante como OH^- e para zeólitas com necessidade de se obter em uma escala menor, moléculas orgânicas atuando como agente direcionador de estrutura (“template” orgânico). Os cátions metálicos inorgânicos, como Na^+ ou K^+ , tem papel importante para neutralização da carga da estrutura. As fontes de sílica são numerosas e incluem sílica coloidal, sílica amorfa, sílica precipitada e fontes orgânicas de silício. As fontes de alumínio são Aluminato de Sódio, Boemita, Hidróxido de Alumínio, Nitrato de Alumínio e Alumina. Normalmente, o agente mineralizador é um metal alcalino na forma de hidróxido, como por exemplo, o hidróxido de sódio ou o íon fluoreto (F^-). O template orgânico é uma espécie orgânica solúvel em água, como por exemplo, os sais quaternários de amônia (Mumpton, 1999).

Os processos físico-químicos que ocorrem durante a síntese da zeólita são bastante sensíveis ao tipo dos reagentes e à ordem de adição dos mesmos. Outros fatores críticos são a velocidade de agitação do sistema (homogeneização da mistura reacional), o envelhecimento do gel, a temperatura e o tempo de cristalização. Existem muitas reações químicas que ocorrem durante o processo de cristalização das zeólitas, e durante a síntese as interações entre as espécies orgânicas e inorgânicas são muito complexas. Sendo assim, fazendo variar a composição da solução (ou gel de síntese) e as condições

operacionais, é possível sintetizar materiais com características estruturais e composições diferentes (Mumpton, 1999; Araújo, 2013). As sínteses de novas estruturas zeolíticas, com propriedades características diferentes, podem ser obtidas ajustando-se variáveis que participam do processo de síntese, como temperatura, pressão, pH, fontes de alumínio, silício e contra-íons catiônicos. Para formar diferentes espécies zeolíticas, usam-se direcionadores orgânicos e também cátions na interação com a rede negativa formada nas ligações tetraédricas entre Si e Al. O tipo de cátion presente pode dirigir a estrutura a ser formada agindo como um molde (“template”). Assim, cátions orgânicos maiores podem levar a um aumento do volume dos canais (Dyer, 1988; Mumpton, 1999; Araújo, 2013).

1.2.4 Zeólitas como agentes hemostáticos coagulantes

Zeólitas têm sido tradicionalmente utilizadas como catalisadores, agente de adsorção e trocadores iônicos (Galownia *et al.*, 2006). Todavia a partir de 1980, o potencial e eficácia do uso de materiais zeolíticos como eficiente agente hemostático ficaram evidenciados quando a empresa norte-americana Z-Médica depositou a primeira patente (United States Patent. Hursey, F. Hartford, W; Dechene, F. J. Pl 4,822,349, 25 abr. 1984, 18 abr. 1989.) descrevendo a invenção ou desenvolvimento de agentes hemostáticos a base de zeólitas. Tratam-se então do agente hemostático chamado comercialmente de Quikclot, produto esse elaborado a partir da zeólita faujasita (FAU) e outros sólidos inorgânicos. Em 2002, a Food and Drug Administration (FDA), aprovou o uso desse agente hemostático, e o mesmo foi usado para cuidados de sangramento em vítimas de guerra. O Quikclot foi amplamente aceito e usado pelas forças de combate norte-americanas durante a guerra do Iraque (2003-2010) e Afeganistão (2001- 2013) (Mcmanus *et al.*, 2007; Kozen *et al.*, 2008; Rhee *et al.*,

2008). O mecanismo proposto para a ação do agente hemostático a base de materiais zeolíticos ocorre através do aumento da adsorção das moléculas de água presentes no sangue. No momento do contato entre a zeólita e o sangue, a área superficial da zeólita desidratada adsorve as moléculas de água, concentrando assim fatores de coagulação e plaquetas do sangue e conseqüentemente acelerando a coagulação (Galownia *et al.*, 2006; Mcmanus *et al.*, 2007). A superfície de carga negativa das zeólitas fornece um ambiente químico favorável que age como um ativador de contato do padrão intrínseco da cascata de coagulação ativando proteínas e fatores (Ostomel *et al.*, 2006), que iniciam uma série de mecanismos em cadeia responsáveis pela associação da enzima trombina e a polimerização da fibrina (Ostomel *et al.*, 2006; Arnaud *et al.*, 2008). Em virtude da adsorção de moléculas de água do plasma sanguíneo, o uso do agente hemostático QuikClot apresentou um efeito negativo bastante sério na sua aplicação pois a adsorção das moléculas de água é uma reação exotérmica que libera energia em forma de calor na superfície do tecido gerando um aquecimento localizado e causando queimaduras (Arnaud *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013). Wright e colaboradores em seus experimentos com porcos anestesiados, aplicou o agente hemostático QuickClot e observou uma elevação da temperatura na superfície do tecido em torno de 95⁰C, enquanto a temperatura na superfície interna do tecido atingiu temperaturas superiores a 50⁰C, a 3mm de profundidade (Wright *et al.*, 2004). Com o objetivo de superar esse problema, outros grupos de pesquisas propuseram o uso de outros tipos de zeólitas como possíveis agentes hemostáticos. Stucky e colaboradores realizaram estudos sistemáticos com zeólita 5A (LTA) visando explorar essa zeólita como possível agente hemostático. Os resultados demonstram que zeólitas 5A (LTA) trocadas com íons de Ca²⁺, apresentavam uma redução na liberação de calor de 680 Joule/g para 420 Joule/g.

Estes resultados bastantes positivos em relação ao uso de zeólitas como agentes

hemostáticos releva a importância dessa classe de minerais e incentiva a busca por novos materiais zeolíticos que possam ser mais efetivos no controle de sangramentos e hemorragias de alto risco, incentivando uma intensa atividade de pesquisa nessa área em vários laboratórios acadêmicos e industriais (Neuffer *et al.*, 2004; Mcmanus *et al.*, 2007; Arnaud *et al.*, 2008; Kozen *et al.*, 2008; Devlin *et al.*, 2011).

Este fenômeno que ocorre com os materiais zeolíticos e o plasma sanguíneo, já foi observado com outros materiais inorgânicos. De acordo com a literatura a exposição do plasma sanguíneo a certos materiais como vidro, caolin, celite e outros materiais com a superfície carregada negativamente tem a capacidade de iniciar reações de ativação de contato que desencadeiam a via intrínseca de coagulação, a via de formação de cinina, e a via de fibrinólise (Margolis, 1957; Griffin, 1978). Ativação da coagulação sanguínea por contato é comumente denominado “*glass effect*”, é o processo pelo qual as superfícies polares carregadas negativamente de certos materiais ativam a via intrínseca da cascata da coagulação do sangue. A ativação de fatores de coagulação XII, XI, precalicreína e quininogênio de alto peso molecular (Ostomel *et al.*, 2006) é iniciado pela exposição do sangue a uma superfície polar externa, e esta por sua vez ativam os numerosos mecanismos de *feedback* responsáveis pela associação da enzima trombina e a polimerização da fibrina (Griffin, 1978; Ostomel *et al.*, 2006). O mesmo princípio do “*glass effect*” pode ser aplicado aos materiais zeolíticos em sua interação com o plasma sanguíneo. Zeólitas, possuem características físico-químicas que permitem diversas aplicações que vão desde o craqueamento de moléculas de petróleo, até agentes hemostáticos que são utilizados nos campos de batalhas das guerras modernas e nos centros cirúrgicos dos grandes hospitais.

1.2.5 Hemostasia

Hemorragias incontroladas são uma das principais causas de mortes de pacientes e podem ocorrer em uma variedade de situações clínicas incluindo traumas, hemorragias pós-operatórias, aneurisma da aorta, hemorragias gastrointestinais, hemorragias obstétricas, entre outros tipos (Neuffer *et al.*, 2004; Chandler, 2013). Após uma lesão traumática, a cessação do sangramento ou hemostasia, se estabelece por meio de uma série de eventos bioquímicos responsáveis pela prevenção da perda de sangue através de vedação local da lesão no sistema vascular (Bertram *et al.*, 2009; Smith, 2009).

A hemostasia é um mecanismo fisiológico complexo, resultado de um conjunto de processos bioquímicos e enzimáticos bem regulados que mantêm o sangue dentro do vaso lesionado, impedindo também a sua coagulação nos vasos sanguíneos normais, e ainda não restringindo o fluxo natural (Carlos e De Sousa Freitas, 2007).

Basicamente, o processo hemostático é dividido em duas principais fases: primária e secundária. A hemostasia primária é iniciada imediatamente após a ruptura do endotélio e é caracterizada pela vasoconstrição, a adesão de plaquetas e formação do tampão plaquetário. Na hemostasia secundária ocorre a ativação da cascata da coagulação envolvendo várias proteínas do plasma, íons cálcio e plaquetas sanguíneas que levam à conversão do fibrinogênio em fibrina. Cada passo da cascata é iniciado e completado por meio de uma série de reações de ativação dos fatores de coagulação. Nos passos finais, a trombina converte o fibrinogênio do plasma em fibrina insolúvel que reforça a agregação plaquetária. Em seguida, ocorre a reticulação de monômeros de fibrina, e conseqüentemente a produção de um coágulo estável. Subseqüentemente a cura da lesão, as plaquetas agregadas e o coágulo de fibrina são retirados e removidos (Riddel *et al.*, 2007; Samudrala, 2008).

1.2.6 Cascata de coagulação

A coagulação sanguínea é uma série complexa de interações nas quais o sangue perde suas características de fluido, sendo convertido em massa semi-sólida, formando um coágulo irreversível, pela interação do tecido lesado, plaquetas e fibrina (Carlos e De Sousa Freitas, 2007).

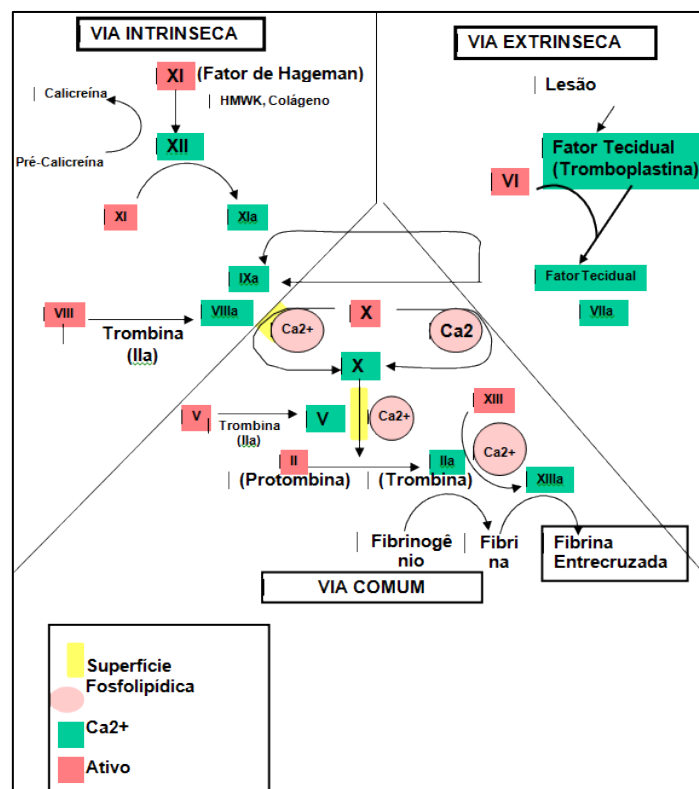
Já o modelo de cascata de coagulação consiste em uma sucessão de passos em que as enzimas clivam os substratos zimogênio (também conhecidos como pró-enzimas) para gerar as próximas enzimas utilizadas na cascata. O modelo é dividido em duas vias: extrínseca (via do fator tissular) e a via de ativação intrínseca (via da ativação de contato) (Smith, 2009). A Figura 6 ilustra resumidamente o esquema de cascata de coagulação com todas essas vias.

O sistema extrínseco é localizado fora do sangue e ocorre quando a ativação do fator VII, pelo fator tecidual, produz a ativação do fator X. O tecido traumatizado libera um complexo de vários fatores, denominado fator tecidual. O fator III, o cálcio e o fator VII formam um complexo que age enzimaticamente na presença de fosfolípidios para converter o fator X para fator X ativado (FXa). O sistema intrínseco é localizado dentro do sangue e é iniciado através da ativação por contato (“glass effect”) dos fatores XII, XI, da pré-caliceína e do cininogênio de alto peso molecular (CAPM) em superfícies carregadas negativamente (polares) (Ostomel *et al.*, 2006; Smith, 2009). A caliceína e o cininogênio de alto peso (CAPM) podem modular a ativação do fator XII. A caliceína então acelera a conversão do fator XII para fator XII ativado (FXIIa). O FXIIa atua enzimaticamente sobre o fator XI para ativá-lo, subsequentemente o FXIa atua sobre o fator IX ativando-o. Por sua vez, o FIXa ao atuar com o FVIIIa, fosfolípidios plaquetários (FP3), ativa o fato X (Carlos e De Sousa Freitas, 2007).

Estas duas vias convergem, formando o caminho comum, o que resulta na

ativação do Fator X convertendo-o em fator X ativado (FXa), formando uma pequena quantidade de trombina. A trombina, por sua vez, atua na conversão do fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina, que são interligados pelo fator XIII ativado (FXIIIa), formando polímeros insolúveis de fibrina. A transformação ou “estabilização” da fibrina solúvel em um coágulo de fibrina insolúvel é catalisada pelo fator XIII, na presença de cálcio, onde o fator XIII normalmente circula no plasma sob a forma de pró-enzima inativa e é convertido em sua forma ativa pela trombina (Carlos e De Sousa Freitas, 2007; Adams e Bird, 2009; Loke *et al.*, 2012).

Figura 6: Esquema da cascata de coagulação (via extrínseca, via intrínseca e via comum).



Fonte:Retirado da literatura (Galvez e Cortes, 2012).

1.2.7 Modelo Celular

Embora o modelo de cascata de coagulação forneça uma estrutura bioquímica para a compreensão de reações de coagulação e base para o estudo de vários distúrbios clínicos de hemostasia, a sua separação em vias intrínsecas e extrínsecas, bem como a ausência de plaquetas e de outros elementos celulares do enquadramento geral, limita a aplicação do modelo *in vivo* para a hemostasia (Becker, 2005).

Todavia, o modelo de coagulação baseado em superfícies celulares considera uma matriz altamente entrelaçada de processos físicos, celulares e bioquímicos que contribuem para a hemostasia como uma série de fases de processo, além disso, propõe a ativação do processo de coagulação sobre diferentes superfícies celulares. O modelo compreende quatro fases que se sobrepõem: iniciação, amplificação, propagação e terminação que ilustram os processos complexos envolvidos na manutenção da integridade vascular (Riddel *et al.*, 2007).

No modelo celular, a hemostasia requer a formação de um tampão de plaquetas e fibrinas impermeável no local da lesão do vaso, mas também exige que as substâncias pró-coagulantes ativada neste processo permaneçam localizados ao local da lesão. O processo de coagulação sanguínea é iniciado por exposição de células que expressam o fator tecidual na corrente sanguínea. O fator tecidual está presente nas membranas das células vizinhas do leito vascular, mas não se encontra, normalmente, em contato com o sangue (Becker, 2005; Ferreira *et al.*, 2010).

Na fase da iniciação, o complexo FT/FVIIa (fator tecidual/fator VII ativado) ativa o FX diretamente e indiretamente através do FIX, transformando pequenas quantidades de protrombina em trombina, que são ainda insuficientes para a realização

do processo de formação da fibrina. A interação entre o FT e o FVIIa é um passo fundamental para o início da coagulação (Gómez e Freire, 2007; Galvez e Cortes, 2012).

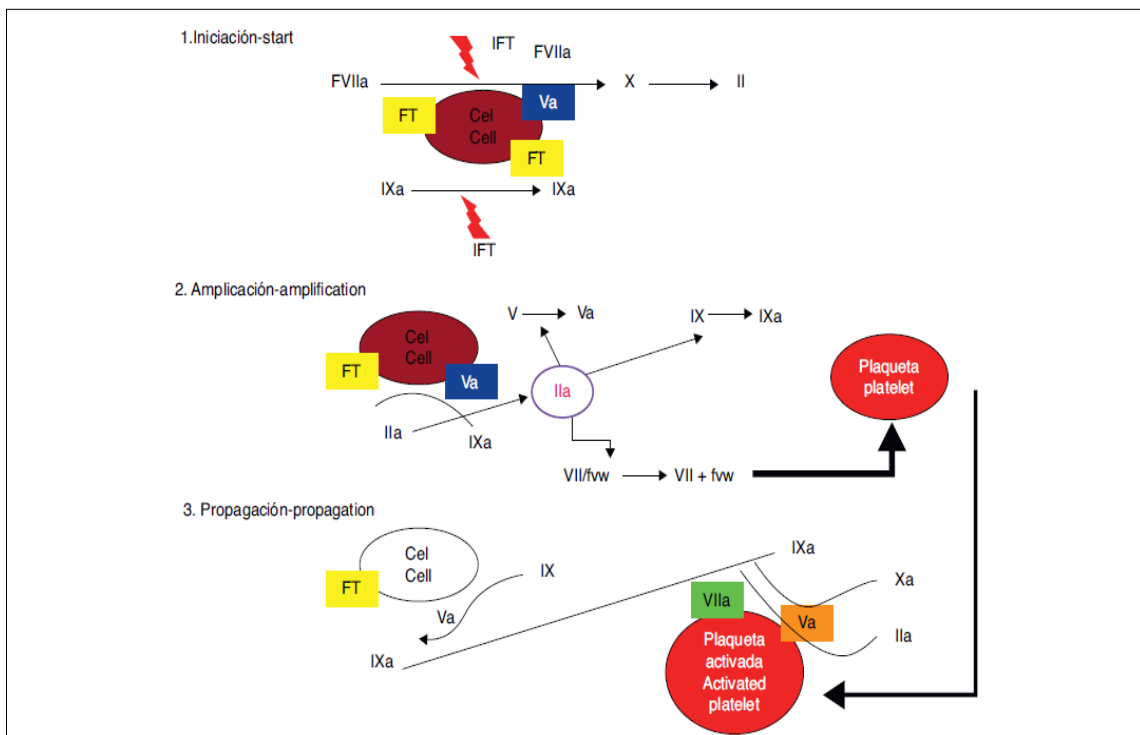
Na fase de amplificação, a trombina, em conjunto com o cálcio do sangue e o fosfolípido derivados das plaquetas, participam ativamente no processo de feedback positivo na ativação dos fatores XI, IX, VIII e V, e, especialmente, para acelerar a ativação plaquetária. Simultaneamente os fatores mencionados são atraídos através de mecanismos quimiostáticos para a superfície das plaquetas, onde os processos de ativação e multiplicação ocorrem rapidamente (Gómez e Freire, 2007). Uma pequena quantidade de trombina produzida pelo complexo FT-FVIIa é essencial para a amplificação, embora seja insuficiente para a formação do coágulo. A trombina é um agente de recrutamento plaquetário muito ativo, e por feedback positivo pode também ativar os fatores V, VIII e XII. A amplificação é também caracterizada pelo sistema de feedback negativo através de anticoagulantes naturais: FTPI (complexo inibidor de FT), antitrombina e proteína C, que desempenha um importante papel na regulação da pró-coagulação (Galvez e Cortes, 2012).

A fase de propagação é caracterizada pelo recrutamento de um grande número de plaquetas para o sítio da lesão e pela produção dos complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas. O FIXa ativado durante a fase de iniciação se liga ao FVIIIa na superfície das plaquetas formando o complexotenase. Como o FXa não pode se mover efetivamente das células que expressam FT para a plaqueta ativada, maior quantidade de FXa deve ser produzida diretamente na superfície da plaqueta pelo complexo FIXa/FVIIIa.

Finalmente, o FXa rapidamente se associa ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protrombinase, o qual

converte grande quantidade de protrombina em trombina. Esta é responsável pela clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que polimerizam para consolidar o tampão plaquetário (Ferreira *et al.*, 2010). O processo final, sempre ocorrendo na superfície da plaqueta, acelera e leva a uma explosão na geração de grandes quantidade de fibrinogênio em fibrina (Gómez e Freire, 2007) enquanto a trombina simultaneamente ativa o FXIII e o inibidor da via do fator tecidual (FTPI) que positivamente adiciona efeitos de estabilização e resistência à plasmina (Galvez e Cortes, 2012). A ativação plaquetária altera a permeabilidade da membrana, permitindo a entrada de cálcio e a liberação de substância quimiostáticas que atraem os fatores de coagulação. O fator V e os fosfolipídeos são liberados ao mesmo tempo, fornecendo o complemento necessário a coagulação (Galvez e Cortes, 2012).

Figura 7: Esquema de outro modelo da cascata de coagulação (O modelo celular).



Fonte: Retirado da literatura (Galvez e Cortes, 2012).

1.2.8 Agentes hemostáticos.

No caso de ferimentos graves, no entanto, a hemostasia é ineficiente e descontrolada. Devido à importância do controle do sangramento em batalhas e intercorrências de choque em civis, pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de estudar a eficácia de *agentes hemostáticos* que podem ser aplicados diretamente sobre a lesão, cessando o sangramento em poucos minutos.

Segundo Pusateri e colaboradores (*Pusateri et al., 2006*) um agente hemostático ideal deve ter a capacidade de parar o sangramento tanto arterial quanto venoso em até 2 minutos depois da aplicação na lesão; deve estar pronto para o uso sem necessidade de preparação prévia ou pessoal especializado; ser de fácil aplicação; deve ser leve e durável; estável e funcional em temperatura ambiente por pelo menos 2 anos; seguro, sem riscos de causar dano a qualquer tecido que seja aplicado; e finalmente, deve ser barato.

Desta maneira, agentes hemostáticos e adesivos teciduais têm surgidos como métodos alternativos para o controle de hemorragias. O mecanismo de ação dos agentes hemostáticos pode ser mecânico ou causar a ativação da cascata de coagulação, enquanto que o adesivo tecidual age por juntar e fechar as bordas da ferida, vedando-a e impedindo o sangramento (*Carvalho et al., 2013*).

Carvalho e colaboradores (*Carvalho et al., 2013*) classificou os agentes hemostáticos e adesivos teciduais em 3 classes: hemostáticos tópicos, adesivos teciduais e vedantes e novos produtos. Dentre os hemostáticos tópicos podemos citar: colágeno, celulose, gelatina, trombina, hidrogel de etilenoglicol. Na classe de adesivos teciduais e vedantes: a gelatina com resorcinol e formaldeído, albumina com glutaraldeído, trombina com matriz de gelatina, fibrina e cianoacrilato. E entre os novos produtos:

alguns polissacarídeos (quitosana), zeólitas e esmectita (Neuffer *et al.*, 2004; Kozen *et al.*, 2008; Devlin *et al.*, 2011).

Na (Tabela 1) estão listados alguns exemplos de agentes hemostáticos utilizados na rotina médica e campos de batalhas. Observa-se a existência de um grande número de preparações com composições e formulações variadas, mecanismos de ação diversos, todavia, todos indicados para combater hemorragias de múltiplas naturezas, porém, a maioria destas formulações ainda não são registradas pela Anvisa, e por isso não comercializada no Brasil.

Tabela 1: Exemplos de alguns agentes hemostáticos juntamente com seus princípios ativos, mecanismos de ação, forma farmacêutica e laboratório responsável.

Medicamento	Princípio ativo	Mecanismo de ação	Forma Farmacêutica	Laboratório
QuikClot	Zeólitas	Adsorção de água do sangue; concentração e ativação dos fatores de coagulação; ativação de alguns fatores da coagulação	Pó	Z-Médica
Combate Gauze	Caolin	Ativação da via intrínseca da coagulação	Rolo de gaze	Z-Médica
Floseal	Gelatina e Trombina	Matriz para formação de coágulo; trombina efeito hemostático	Kit com pó liofilizado	Baxter
Lyostypt	Colágeno	Adesão dos trombócitos; ativação do FXII da coagulação	Compresas	B Braun
Gelfoam*	Gelatina Absorvível	Matriz física para iniciação da coagulação	Esponja cirúrgica	Pfizer
HemCon	Quitossana	Barreira física mucoadesivo no local da lesão	Pastilhas	HemCon Inc. ,
Trauma DEX	Microesferas polissacarídeos	Diminuição do líquido tecidual local; aumento da concentração de fatores de coagulação	Fluido	Medafor
Celox*	Extrato Seco de Vitis vinífera Linne	Formação de coágulos; indução de ligação entre glóbulos vermelhos	Cápsulas	SAM Médica

*Agentes hemostáticos comercializados no Brasil

Fonte: Retirado da literatura (Griffin, 1978; Krüger, 1992; Oz *et al.*, 2003; Neuffer *et al.*, 2004; Galownia *et al.*, 2006; Kozen *et al.*, 2008; Devlin *et al.*, 2011)

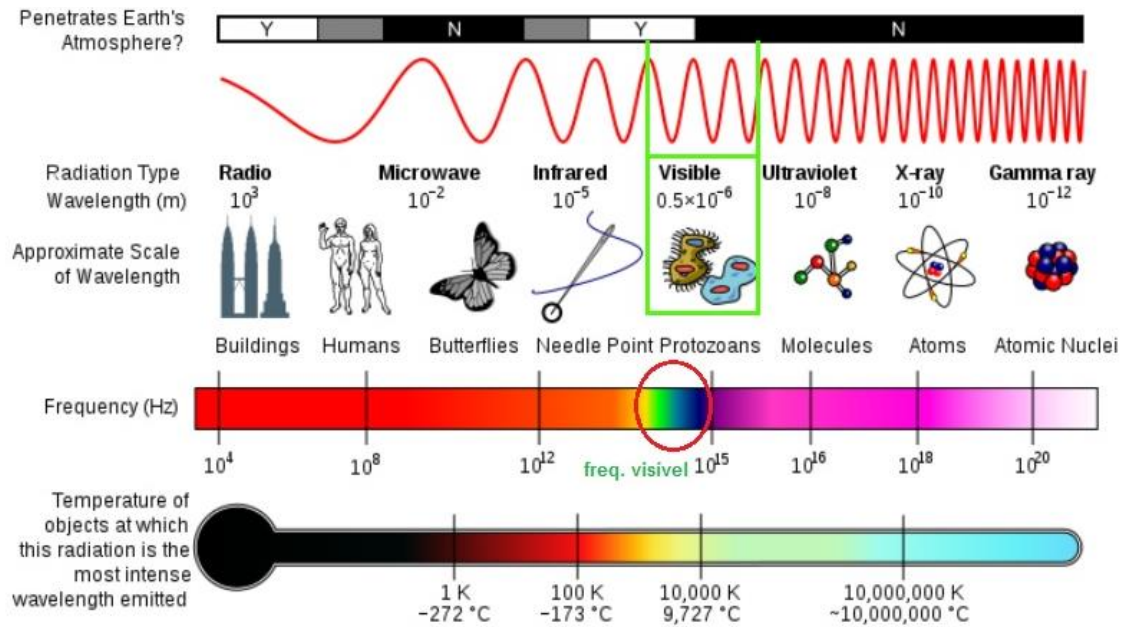
2. Fundamentação Teórica

2.1 Aquecimento convencional e aquecimento por radiação na faixa do micro-ondas na síntese.

As sínteses de materiais cristalinos são tradicionalmente realizados sob aquecimento convencional, onde uma fonte de calor externa (forno) aquece o meio reacional através da condução de calor, todavia esta forma de transferência é muito lenta e dependente da condutividade térmica do reator onde o gel de síntese está inserido o que provoca na maioria das vezes um gradiente de temperatura resultando em uma temperatura do reator superior ao do gel durante o processo de aquecimento, este efeito acaba provocando uma lentidão para que se atinja o equilíbrio térmico. Este gradiente de temperatura e a lentidão no processo de transferência de energia resulta em um produto com uma distribuição de tamanho e fases heterogêneas, o que não é interessante do ponto de vista de aplicação.

Uma alternativa para contornar esses aspectos negativos gerados no processo de síntese de materiais cristalinos foi a substituição da fonte de aquecimento convencional pela fonte de radiação de ondas eletromagnéticas na faixa de micro-ondas. A radiação de micro-ondas é composta de ondas eletromagnéticas que possuem frequências na faixa de 10^8 - 10^{12} Hz e comprimento de onda em média de 10^{-2} m (Figura 8), estas ondas não são absorvidas pelo reator de Pyrex[®] que possui faixa de absorbância de 300-340nm (Almeida *et al.*, 2014) e interagem diretamente com a matéria presente no gel de síntese causando migração iônica e rotação de dipolos elétricos sem possuir energia suficiente para desfazer as ligações químicas já realizadas no processo de envelhecimento do gel (Tompsett *et al.*, 2006).

Figura 8: Faixa espectral dos possíveis comprimentos de onda e frequência das ondas eletromagnéticas.

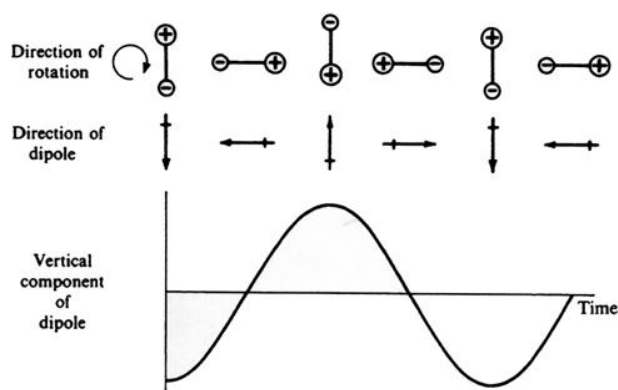


Fonte:Retirado da literatura (Smart e Moore, 2012).

Quando a radiação na faixa de micro-ondas entra em contato com o gel de síntese, os dipolos elétricos presentes na amostra se alinham com a componente elétrica da onda eletromagnética que oscila no espaço e no tempo transformando energia potencial elétrica em energia cinética de rotação e como consequência promovendo o aumento a energia interna do sistema (Tompsett *et al.*, 2006). Outro efeito que atua concomitantemente à rotação dos dipolos elétricos para aquecer a amostra é o movimento dos íons gerados pela transformação da energia potencial elétrica da onda em energia cinética de translação que também contribui para o aumento da energia interna do sistema. Além do mais, o processo de absorção das ondas eletromagnéticas gera um grande número de pontos quentes na amostra e favorece a formação de núcleos

que diferentemente do aquecimento convencional começa a se formar a partir das paredes do reator. Por conta disso, o tamanho das partículas geradas é mais uniforme (Tompsett *et al.*, 2006).

Figura 9- Orientação dos dipolos presentes na amostra provenientes da interação com as ondas eletromagnéticas.



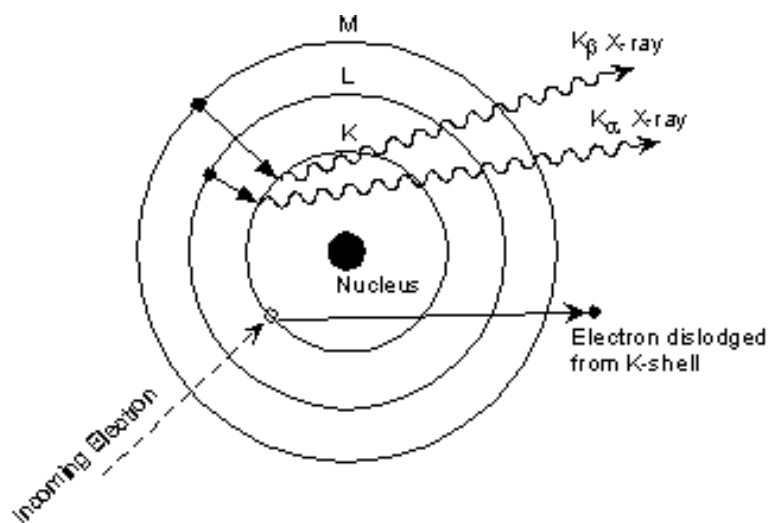
Fonte:Retirado da literatura (Wang, 1986).

2.2 Técnicas Físico-Químicas para caracterização de materiais.

2.2.1 Difração de Raios-X (DRX)

O Raio-X é uma radiação eletromagnética com comprimento de onda na ordem de 10^{-10} m. Esta radiação é gerada quando um elétron com alta energia, proveniente do cátodo do aparelho, incide em um metal (ânodo). Tal energia é o suficiente para extrair um elétron de uma camada mais interna de um átomo que compõe o ânodo, ficando assim um espaço vazio, o qual é preenchido por um elétron proveniente de uma camada mais externa, que libera energia para conseguir ocupar o espaço livre. (Griffiths, 1995) (Figura 10).

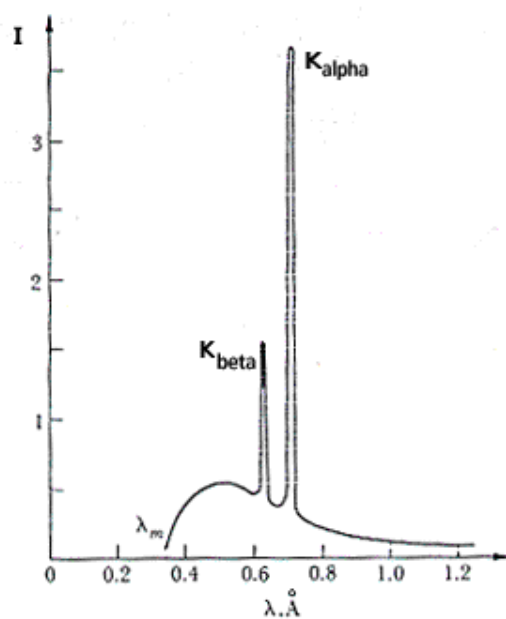
Figura 10: Esquema de produção de raio-x.



Fonte: Retirado da literatura (Wang, 1986).

Esta energia é liberada em forma de radiação eletromagnética em diferentes comprimentos de onda (Figura 11), conhecida por Raio-X.

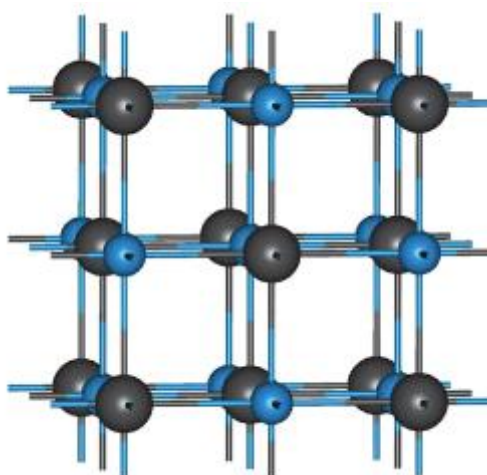
Figura 11: Comprimentos de onda liberado segundo o decaimento de elétrons da nuvem eletrônica do átomo.



Fonte: Retirado da literatura (Cullity, 2001).

A difratometria de Raios-X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, como por exemplo a estrutura da Figura 12. Os Raios-X ao atingirem um material podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo (dispersão ou espalhamento coerente). O fóton de Raios-X após a colisão com o elétron muda sua trajetória, mantendo, porém, a mesma fase e energia do fóton incidente. Sob o ponto de vista da física moderna, pode-se dizer que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e reemitida; cada elétron atua, portanto, como centro de emissão de Raios-X. Se os átomos que geram este espalhamento estiverem arranjados de maneira sistemática, como em uma estrutura cristalina, apresentando entre eles distâncias próximas ao do comprimento de onda da radiação incidente, pode-se verificar que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e que efeitos de difração dos Raios-X podem ser observados em vários ângulos (Cullity, 2001).

Figura 12: Exemplo de estrutura cristalina do NaCl, onde as esferas em preto são os modelos dos átomos de Cl e as esferas azul são os modelos do átomo de Na.



Fonte: Retirado da literatura (Smart e Moore, 2012).

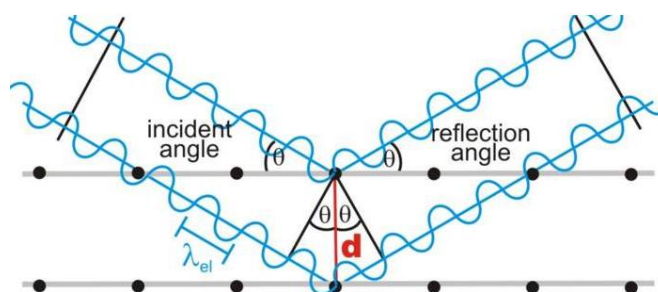
A intensidade difratada, dentre outros fatores, é dependente do número de elétrons no átomo; adicionalmente, os átomos são distribuídos no espaço, de tal forma que os vários planos de uma estrutura cristalina possuem diferentes densidades de átomos ou elétrons, fazendo com que as intensidades difratadas sejam, por consequência, distintas para os diversos planos cristalinos (Cullity, 2001; Kittel, 2006).

Considerando-se dois ou mais planos de uma estrutura cristalina (Figura 13), as condições para que ocorra a difração de raios X (interferência construtiva ou em uma mesma fase) vão depender da diferença de caminho percorrida pelos Raios-X e o comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela lei de Bragg, ou seja:

$$n \lambda = 2d \sin \theta \quad (\text{Equação 1})$$

Onde λ corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente, n a um número inteiro (ordem de difração), d à distância interplanar para o conjunto de planos hkl (índice de Miller) da estrutura cristalina e θ ao ângulo de incidência dos Raios-X (medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos) (Cullity, 2001; Kittel, 2006).

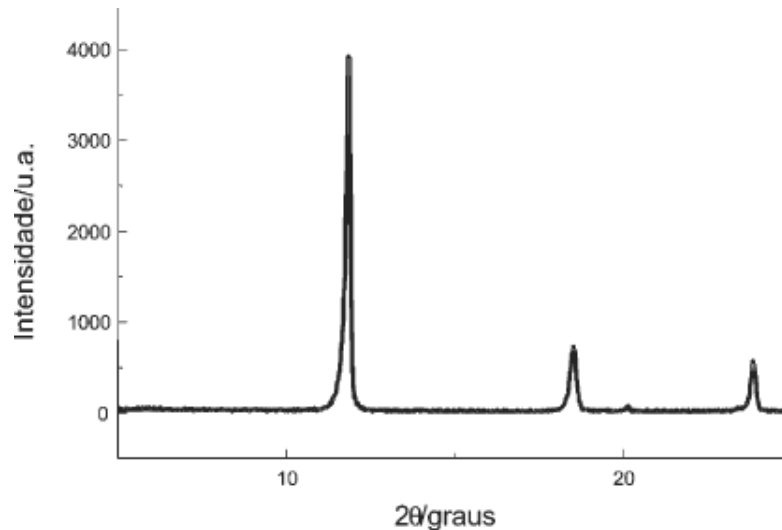
Figura 13: Exemplo ilustrativo da lei de Bragg referente aos planos cristalinos.



Fonte: Retirado da literatura (Smart e Moore, 2012).

Os resultados do experimento de difração são representados graficamente (Figura 14), onde o eixo y contém a intensidade dos raios difratados pelos planos cristalinos e o eixo x representa o ângulo de difração (2θ).

Figura 14: Exemplo de Difratoograma.

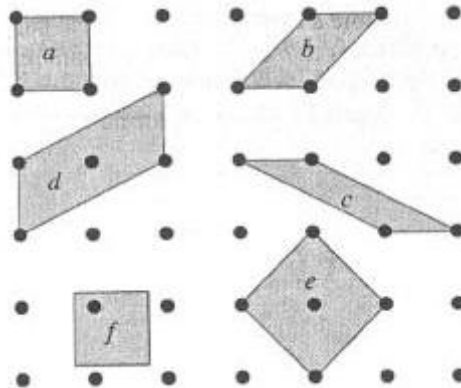


Fonte: Retirado da literatura (Cullity, 2001)

O pico no difratograma representa a condição de Bragg para interferências construtivas de onda, ou seja, cada pico representa um conjunto de planos cristalinos (índices hkl de Miller) da amostra paralelos entre si, portanto se forem determinados os conjuntos de planos de todos os picos pode-se determinar quais são as possíveis formas tridimensionais geométricas que se formam com estes planos e encontrar estruturas tridimensionais primárias que se repetem periodicamente no material (redes primitivas).

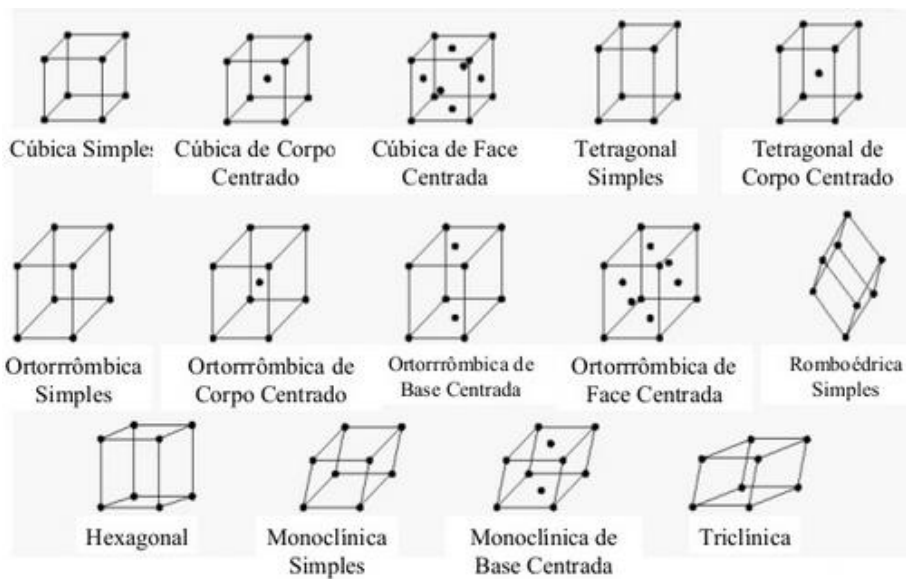
Em duas dimensões temos as possíveis formas de planos primitivos (Figura 15) que se combinam e formam estruturas tridimensionais que denominam-se redes primitivas e redes de Bravais (Figura 16).

Figura 15: Planos primitivos ou células unitárias.



Fonte: Retirado da literatura (Smart e Moore, 2012).

Figura 16: Redes primitivas e redes de Bravais.

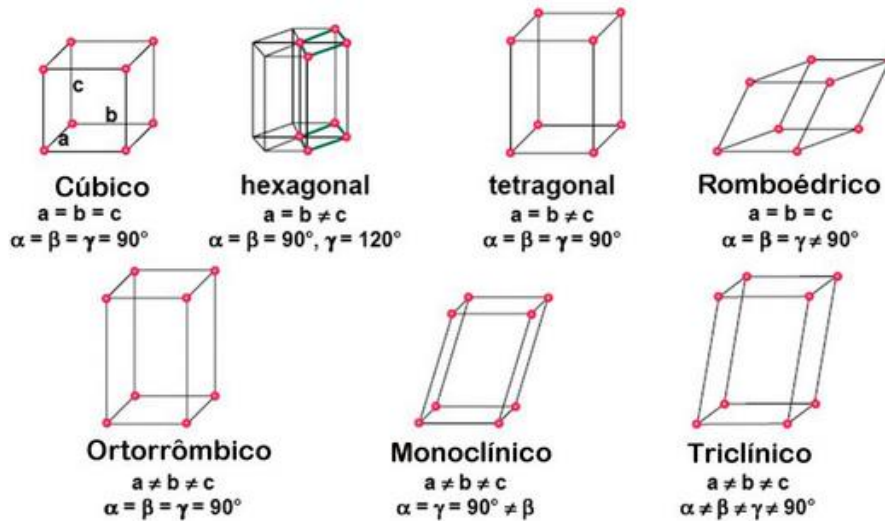


Fonte: Retirado da literatura (Smart e Moore, 2012).

Cada rede possui três arestas (a , b , c) de comprimentos variados e ângulos variados (α , β , γ) e quem oferece estas informações são as indexações dos picos de difração indicando quais são os índices de Miller.

A partir dos dados das arestas e dos ângulos que elas formam encontra-se a rede presente no sólido (Figura 17).

Figura 17: Tipos de Redes primitivas.

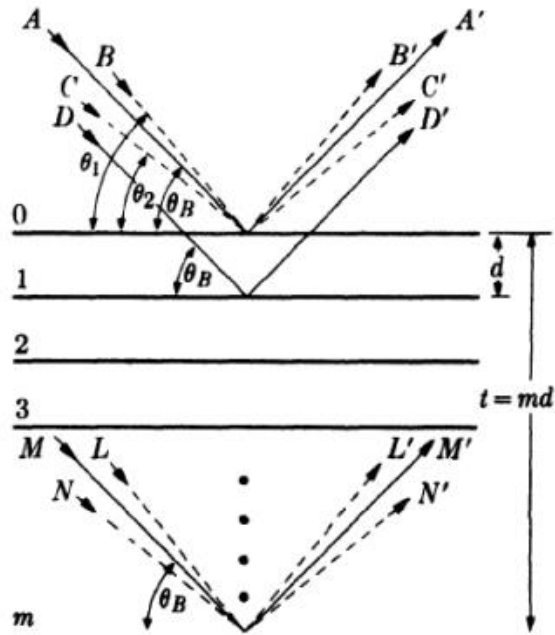


Fonte: Retirado da literatura (Smart e Moore, 2012).

Outro dado que podemos tirar do difratograma é o tamanho médio dos cristais e para isto pode-se utilizar a equação de Scherrer. Essa equação é deduzida com base na largura dos picos de um padrão de difração de Raios-X (Cullity, 2001) e será mostrada em seguida.

Seja um cristal com espessura t medida na direção perpendicular aos planos cristalinos, como ilustrado na Figura 18. O cristal possui $(m + 1)$ planos e sua espessura é $t = md$, onde d é a distância entre os planos.

Figura 18: Modelo ilustrativo de um cristal na dedução da equação de Scherrer.

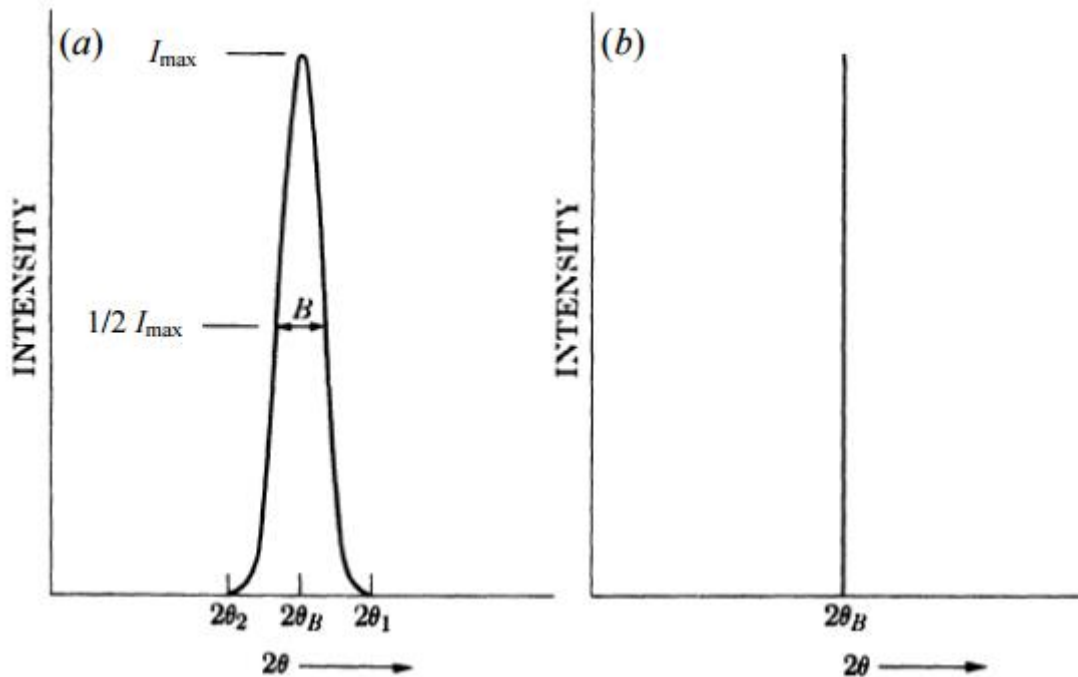


Fonte: Retirado da literatura (Cullity, 2001).

Na figura, os raios A, D e M fazem exatamente o ângulo de Bragg (θ_B) com os planos cristalinos. Considerando a lei de Bragg, podemos observar que o raio D', refletido pelo primeiro plano abaixo da superfície é $1 \cdot \lambda$ fora de fase com o raio A' e o raio M', refletido pelo m-ésimo plano abaixo da superfície é $m\lambda$ fora de fase com A'. Portanto, no ângulo de difração $2\theta_B$, A', D' e M' irão interferir construtivamente, resultando em um feixe com intensidade máxima. O raio B, no entanto, faz um ângulo θ_1 com o plano da superfície que é um pouco maior do que θ_B , sendo que o raio L' será $(m + 1)\lambda$ fora de fase com B'. Isso significa que na metade do caminho entre B' e L' haverá um plano espalhando um raio que será $(n + 1/2)\lambda$ fora de fase com B', sendo n um inteiro, e esses raios se cancelarão. O mesmo acontecerá com o raio C, que faz um ângulo θ_2 com a superfície, onde θ_2 é menor do que θ_B , sendo o raio N' $(m - 1)\lambda$ fora de fase com C'. Portanto, a intensidade dos raios difratados a um ângulo $2\theta_1$ e $2\theta_2$ será zero e aqueles difratados a ângulos entre $2\theta_1$ e $2\theta_2$, próximos a $2\theta_B$, terão intensidade intermediária à intensidade máxima e zero. A curva da intensidade de difração em

relação ao ângulo de difração 2θ terá a forma como mostrada na Figura 19 (a), contrastando com a curva para um caso hipotético onde as difrações ocorrem exatamente no ângulo de Bragg, mostrado na Figura 19 (b).

Figura 19: Curvas de difração em cristal: (a) caso real, (b) caso hipotético.



Fonte: Retirado da literatura (Cullity, 2001)

A largura à meia altura do pico B , de forma rude, pode ser dada pela metade da diferença entre $2\theta_1$ e $2\theta_2$ (Equação 2):

$$B = \frac{1}{2}(2\theta_1 - 2\theta_2) = \theta_1 - \theta_2 \quad (\text{Equação 2})$$

A diferença de caminho para estes dois ângulos será:

$$2t \sin \theta_1 = (m + 1)\lambda \quad (\text{Equação 3})$$

$$2t \sin \theta_2 = (m - 1)\lambda \quad (\text{Equação 4})$$

Subtraindo as equações 3 e 4, teremos:

$$t (\text{sen}\theta_1 - \text{sen}\theta_2) = \lambda \quad (\text{Equação 5})$$

Substituindo a relação trigonométrica abaixo:

$$\text{sen}\theta_1 - \text{sen}\theta_2 = 2\cos\left(\frac{\theta_1 + \theta_2}{2}\right)\text{sen}\left(\frac{\theta_1 - \theta_2}{2}\right) \quad (\text{Equação 6})$$

Na Equação 7, teremos:

$$2t\cos\left(\frac{\theta_1 + \theta_2}{2}\right)\text{sen}\left(\frac{\theta_1 - \theta_2}{2}\right) = \lambda \quad (\text{Equação 7})$$

Como θ_1 e θ_2 são muito próximos de θ_B , podemos considerar que

$$\theta_1 + \theta_2 \propto 2\theta_B \quad (\text{Equação 8})$$

8)

e

$$\text{sen}\left(\frac{\theta_1 - \theta_2}{2}\right) \propto \frac{\theta_1 - \theta_2}{2} \quad (\text{Equação 9})$$

Portanto,

$$2t\left(\frac{\theta_1 - \theta_2}{2}\right)\cos\theta_B \propto \lambda \quad (\text{Equação 10})$$

$$t \propto \frac{\lambda}{\beta \cdot \cos\theta_B} \quad (\text{Equação 11})$$

Pode-se então trocar o símbolo de proporcionalidade por uma constante e chegar-se na equação de Scherrer, onde a constante está relacionada com o formato do cristal (Cullity, 2001):

$$t = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta_B} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde λ é o comprimento de onda do Raio-X incidente, β ($\theta_1 - \theta_2$) é a largura a meia altura do pico de difração mais intenso, o θ_B é o ângulo de Bragg e K é a constante que depende do formato do material.

Diversos fatores podem contribuir para o alargamento dos picos de difração. Entre eles estão a divergência dos feixes causada por condições experimentais do equipamento (fator instrumental) e a não uniformidade dos tamanhos das partículas.

Uma correção na largura do pico na equação de Scherrer, leva em conta o fator instrumental. Portanto para que seja feita esta correção o β passa a valer $\sqrt{B^2 + b^2}$, onde B e b são a largura à meia altura da fase de interesse e de uma amostra padrão, respectivamente. Esse padrão pode ser o Si ou o LaB₆, que possuem partículas grandes e uniformes, de modo que o alargamento observado em seus picos de difração pode ser atribuído principalmente ao fator instrumental (Cullity, 2001).

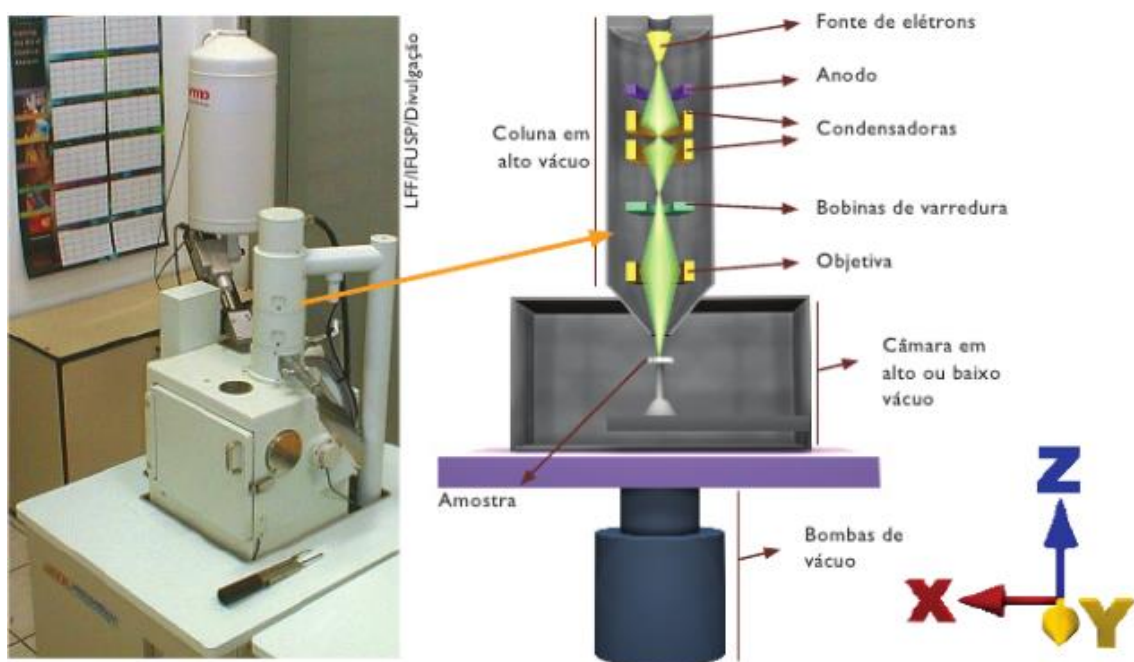
2.2.2 Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV) e Transmissão de alta resolução (MET)

A demanda crescente em áreas de biologia e ciências dos materiais para observação de objetos com dimensões cada vez mais reduzidas fez com que pesquisadores do mundo todo buscassem teorias que aprimorassem microscópios e fosse possível a observação de estruturas com dimensões ínfimas (Dedavid *et al.*, 2007; Goldstein *et al.*, 2012). Os microscópicos mais antigos usam o conceito de ondas eletromagnéticas (microscópio fotônico), onde um feixe de luz (visível) incide no objeto a ser analisado e este feixe exibe o fenômeno de difração levando as informações referentes a amostra para os detectores onde é gerado uma imagem deste objeto em tamanho ampliado, todavia para que ocorra o efeito de difração a onda eletromagnética deveria possuir o comprimento de onda da ordem do tamanho do material a ser estudado e as ondas eletromagnéticas visíveis possuem uma faixa fixa de comprimento de onda (380-740nm) que permitem a observação de tamanhos limitados, estes comprimentos não permitem a observação de estruturas sub celulares menores (Dedavid *et al.*, 2007; Goldstein *et al.*, 2012).

Para contornar essa limitação que os microscópios fotônicos possuem, foram desenvolvidos microscópios onde o feixe de ondas eletromagnéticas foi substituído por

feixe de elétrons acelerados em alta voltagem, esta substituição de feixes foi interessante pois em 1925 De Broglie descreveu a propriedade dual das partículas onde a relação deduzida por ele mostrava que o comprimento de onda atingido é inversamente proporcional a sua velocidade (Griffiths, 1995), neste contexto o elétron pode ter seu comprimento de onda variado em uma extensa faixa dependente da tensão de aceleração e pode atingir um comprimento de onda de até mesmo 0,005 Å e assim objetos sub celulares podem ser vistos em um microscópio eletrônico (Watt, 1997; Dedavid *et al.*, 2007). A Figura 20 mostra um exemplo de microscópio eletrônico

Figura 20: Exemplo de microscópio Eletrônico.

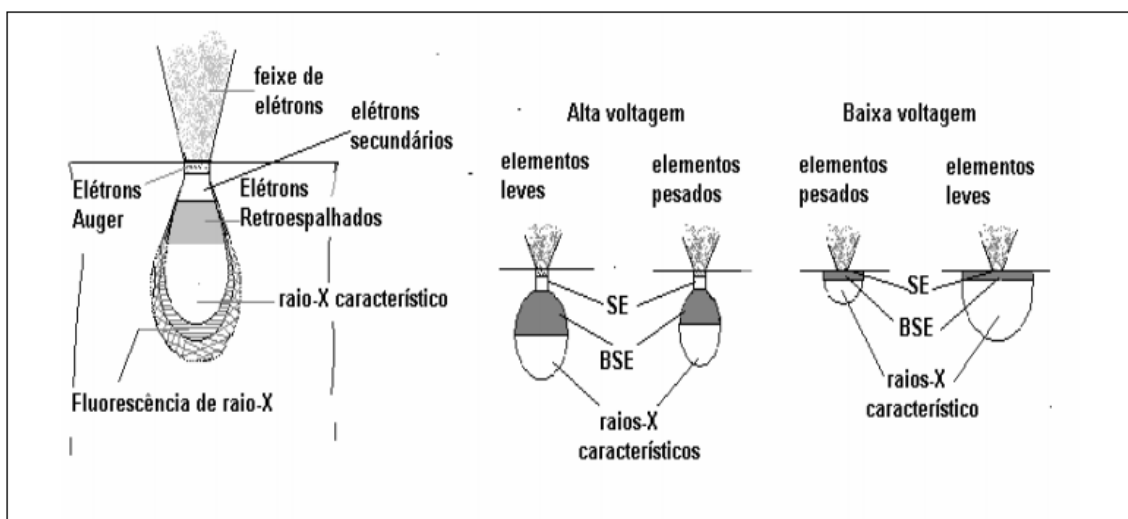


Fonte: Retirado da literatura (Dedavid *et al.*, 2007).

Os microscópios eletrônicos existentes são o de varredura (MEV) e transmissão (MET). O microscópio de varredura consiste em gerar um feixe estreito de elétrons acelerados por uma tensão na faixa entre 1 a 50kV que quando incidido na amostra desloca elétrons e gera fótons que são captados pelos detectores e convertidos em imagem através de operadores matemáticos conhecidos como transformadas (Watt,

1997; Dedavid *et al.*, 2007). A profundidade deste feixe incidente na amostra depende da tensão em que os elétrons são acelerados e do número atômico da amostra (Figura 21), porém a finalidade deste tipo de microscopia é gerar análises que necessitam de uma profundidade de penetração baixa (amostra pode ser espessa) dando informações da superfície da amostra (Watt, 1997).

Figura 21: Profundidade de penetração do MEV.



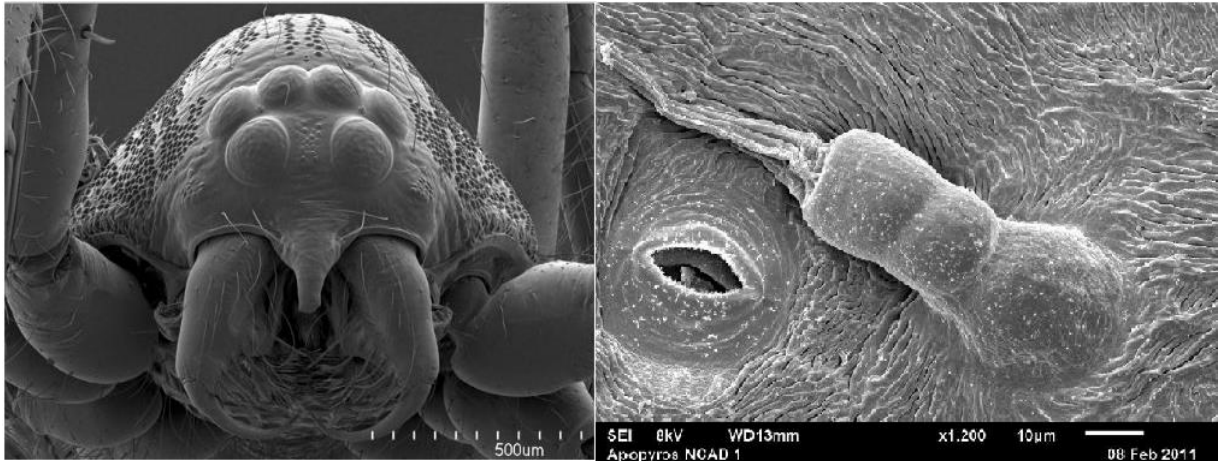
Fonte: (Dedavid *et al.*, 2007)

O feixe principal de elétrons ao entrar em contato com a amostra pode gerar vários sinais, tais como elétrons secundários, elétrons retroespalhados, catodoluminescência e espectrometria de Raios X por energia dispersiva (EDX) (Watt, 1997; Dedavid *et al.*, 2007).

Os elétrons secundários, são os elétrons que são ejetados dos orbitais menos energéticos dos átomos que compõem a amostra, estes elétrons saem com energia baixa (em torno de 50eV) e são os responsáveis por formar as imagens de alta resolução da superfície do material alvo de estudo, revelando assim a morfologia do material (Goldstein *et al.*, 2012). A Figura 22 mostra dois exemplos de morfologia revelada pelo MEV, na micrografia à esquerda tem-se a superfície de um ácaro e na micrografia à

direita tem-se um estômato de um vegetal (Watt, 1997).

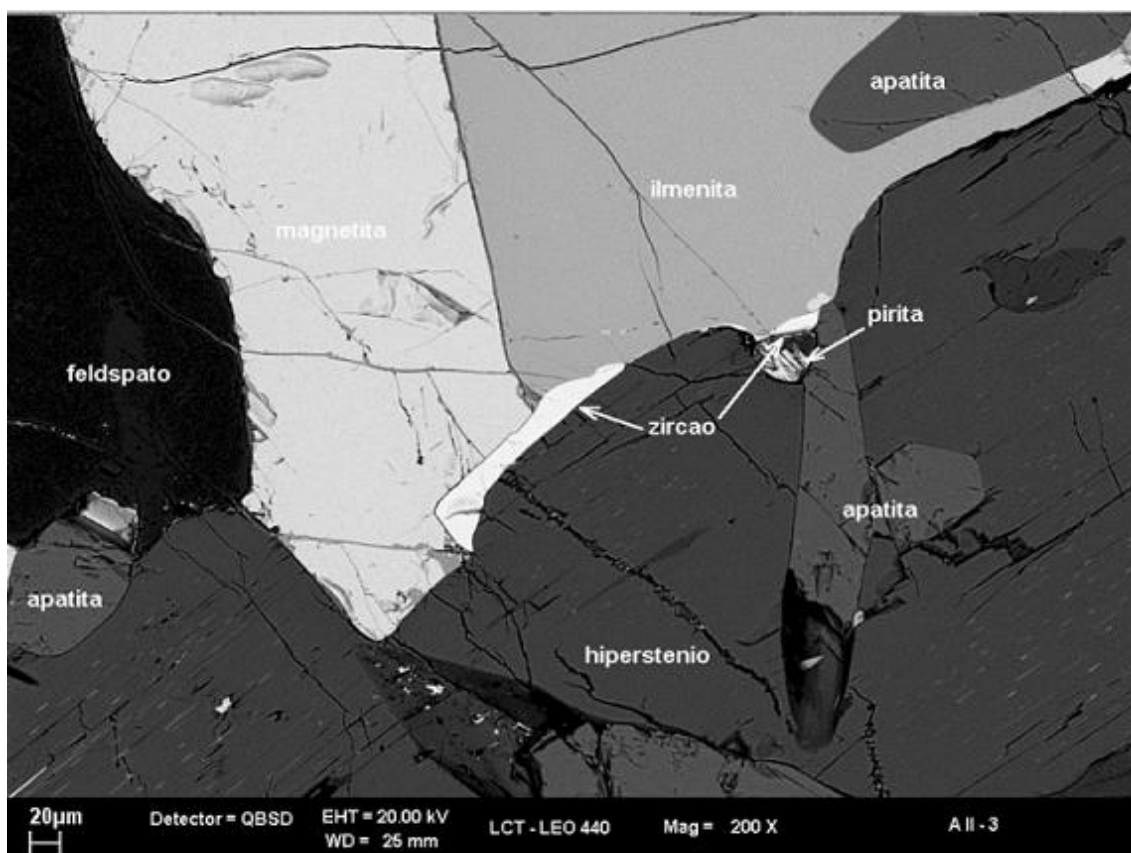
Figura 22: Imagens de superfície geradas pelo MEV, onde na região da esquerda tem-se a superfície de um ácaro e na região da direita tem-se um estômato presente em um vegetal.



Fonte: Retirado da literatura (Watt, 1997).

Os elétrons retroespalhados são aqueles elétrons do feixe principal que sofrem espalhamento elástico ao colidirem com os elétrons presentes nos orbitais dos átomos da amostra e esses elétrons geram uma imagem de contraste de acordo com o número atômico dos elementos presentes na amostra, é possível identificar cada elemento devido as diferenças nas densidades eletrônicas que átomos de cada elemento possuem, ou seja, os elétrons que colidem com estes átomos podem ser mais ou menos desviados (Watt, 1997; Dedavid *et al.*, 2007). A Figura 23 revela o resultado de contraste de número atômico obtido por MEV de uma amostra de rocha, onde cada coloração da imagem representa composições diferentes da rocha.

Figura 23: Imagem de contraste de número atômico.



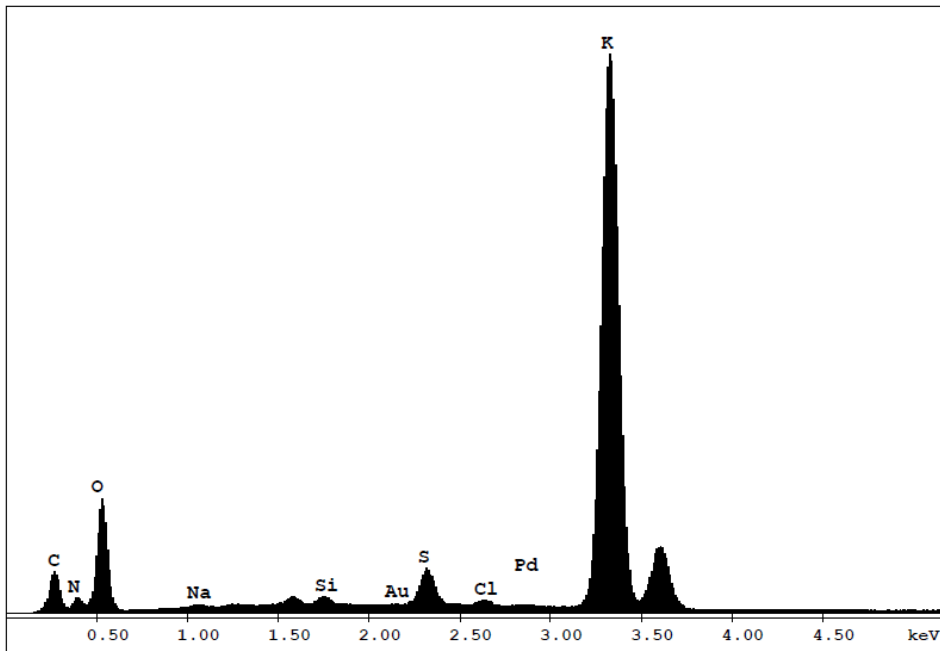
Fonte:(Dedavid *et al.*, 2007)

O efeito de catoluminescência ocorre quando materiais isolantes ou semicondutores são bombardeados pelo feixe de elétrons, devido a esse bombardeio fótons de grande comprimento de onda (ultravioleta e visível) são emitidos e captados. (Dedavid *et al.*, 2007; Goldstein *et al.*, 2012).

A espectrometria de Raios-X por energia dispersiva (EDX) é uma análise de alta importância para a determinação da composição química da superfície dos materiais, esta técnica consiste em captar os raios-x gerados pelo decaimento de elétrons (Figura 10) das nuvens eletrônicas dos átomos presentes na amostra que foram excitados pelo feixe principal do microscópio (Goldstein *et al.*, 2012).

Os elementos distintos possuem decaimentos distintos dos elétrons que foram excitados e por conta disto e analisando a energia referente aos raios-x dos decaimentos, pode-se determinar os elementos presentes na superfície da amostra gerando um gráfico semi-quantitativo como o da Figura 24 (Goldstein *et al.*, 2012)

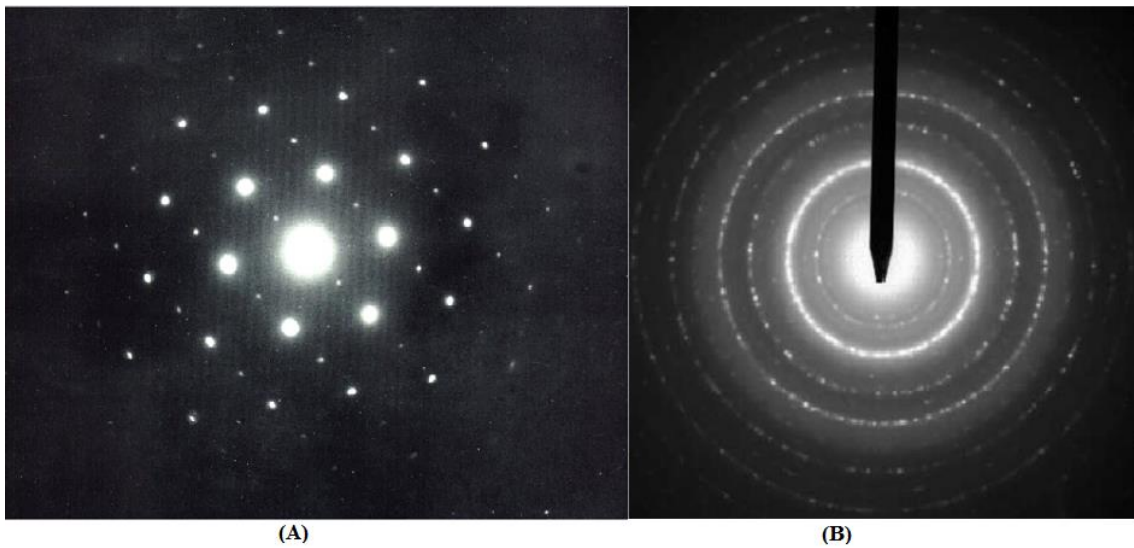
Figura 24: Análise de EDX.



Fonte: Autoria própria.

Ao contrario do microscópio eletrônico de varredura, o microscópio eletrônico de transmissão (MET) necessita de uma amostra fina devido aos tipos de análise que esta técnica oferece. O feixe de elétrons principal no MET ultrapassa a amostra oferecendo informações de dentro da estrutura, este feixe pode difratar dependendo das características da amostra e neste caso ele oferece um padrão de difração como o da Figura 25 que quando resolvido pode-se determinar quais as direções que os planos estão orientados e quais são eles com seus respectivos índices de Miller (Watt, 1997).

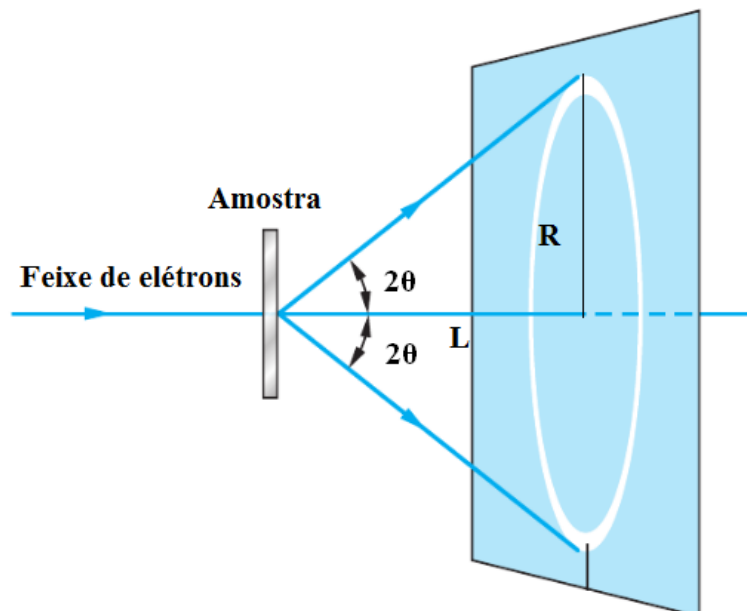
Figura 25: Exemplos de padrões de difrações de elétrons (A) de monocristais (B) de policristais.



Fonte: Retirado da literatura (Watt, 1997)

A Figura 26 ilustra o experimento da difração de elétrons para policristais e como se forma o padrão em halo da Figura 25 b:

Figura 26: Modelo de difração de elétrons em policristais.



Fonte: Retirado da literatura (Smart e Moore, 2012).

Para relacionar os parâmetros R (raio do halo de difração) e L (comprimento de câmara) do experimento com os valores d (Distância entre dois planos cristalinos paralelos) e λ (comprimento de onda dos elétrons) utiliza-se a relação de Bragg $2\text{sen}\theta=\lambda/d$ (Cullity, 2001) e a geometria do experimento:

$$\tan 2\theta = \frac{R}{L} = \frac{\text{sen } 2\theta}{\cos 2\theta} = \frac{2 \text{sen } \theta \cdot \cos \theta}{\cos^2 \theta - \text{sen}^2 \theta} \quad (\text{Equação 13})$$

Para ângulos θ pequeno temos $\cos\theta=1$, portanto a equação X se reduz:

$$\frac{R}{L} = 2 \text{sen } \theta \quad (\text{Equação 14})$$

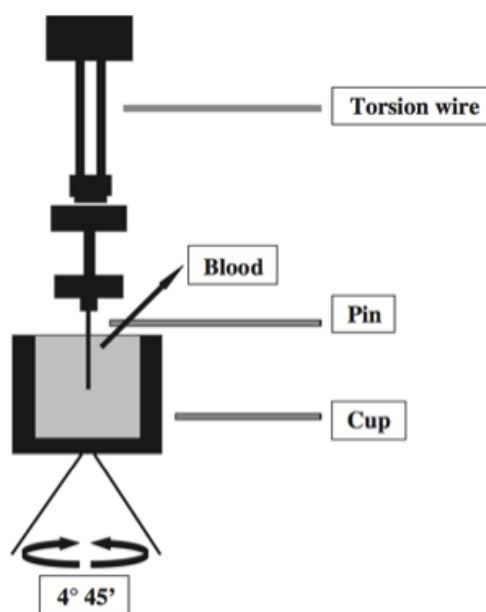
Substituindo $2\text{sen}\theta$ por λ/d vindo da equação de Bragg temos a equação que a partir do padrão de difração pode-se obter as distâncias cristalinas d do cristal:

$$d = \frac{\lambda \cdot L}{R} \quad (\text{Equação 15})$$

2.3 Tromboelastografia (TEG)

A tromboelastografia (TEG) é um método experimental *in vitro* que permite a avaliação global do processo de iniciação, formação, estabilização e quebra do coágulo, documentando a interação das plaquetas e outras células sanguíneas com as proteínas da coagulação. São avaliadas as propriedades elásticas do coágulo que fornece uma avaliação global da função hemostática. As alterações que ocorrem durante a coagulação são registradas, fornecendo uma representação gráfica do processo de polimerização da fibrina e também da força do coágulo (Bolliger *et al.*, 2012). A Figura 27 possui o esquema de um tromboelastógrafo:

Figura 27: Ilustração de um modelo de tromboelastógrafo.



Fonte: Retirado da literatura (Carlos e De Sousa Freitas, 2007)

Como mostra a Figura 27, o tromboelastógrafo contém um cup onde o sangue é colocado e este cup é mantido sob oscilação. Além disso, o tromboelastógrafo possui um pin que é posicionado dentro do cup, em contato com o sangue. Como mostrado na Figura 27, o cup faz a ligação entre o que acontece na amostra e o fio de torção, que registra as mudanças ocorridas no sangue.

Quando o sangue, ainda fluídico, é colocado no cup não existem forças de aderência entre o sangue e o pin, que como consequência se mantém parado. Com o passar do tempo o processo de formação do coágulo se inicia e a partir desse momento acontece a aderência do sangue ao pin, como o cup está rotacionando o pin é “levado” a fazer o mesmo movimento já que está aderido ao coágulo em formação. Como no início o coágulo ainda é “fraco” e a aderência ainda é baixa, o sinal é registrado com uma amplitude pequena, como mostra a Figura 29. Na medida em que o coágulo se forma (processo de formação) a aderência aumenta e como consequência há um movimento maior do pin que é registrado pelo equipamento como uma oscilação de amplitude

maior. O coágulo passa pela fase de estabilização na qual permanece aderido à sonda que não sofre mudanças significativas na amplitude de oscilação e posteriormente o processo de quebra do coágulo se inicia, como consequência as forças de aderência diminuem e portanto a amplitude de oscilação também.

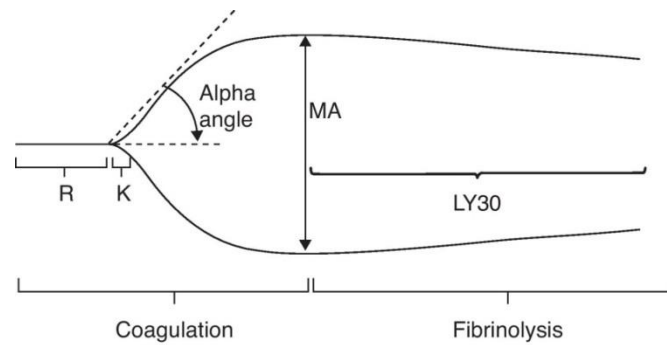
A Figura 28 apresenta o resultado padrão de um tromboelastograma que é gerado a partir das oscilações (figura 30) registradas pelo equipamento durante o processo de coagulação.

O TEG fornece os seguintes parâmetros:

- 1) tempo de reação: caracterizado como R, é o tempo de formação de um coágulo reconhecível que é medido a partir do início do experimento e finalizado quando a amplitude de rotação da sonda atinge 2mm (Ostomel *et al.*, 2007; Bolliger *et al.*, 2012);
- 2) tempo de coagulação: caracterizado como K, este parâmetro equivale ao tempo que inicia a partir de R e se prolonga até o a amplitude de rotação da sonda atingir 20 mm, este parâmetro mostra a formação de um coágulo relativamente firme e estável (Ostomel *et al.*, 2007; Bolliger *et al.*, 2012);
- 3) ângulo α (alfa): inclinação entre R e K, é diretamente proporcional a taxa de geração de trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina (Ostomel *et al.*, 2007; Bolliger *et al.*, 2012);
- 4) MA, maior amplitude ou amplitude máxima, é diretamente proporcional a propriedade elástica da fibrina e adesão plaquetária (Ostomel *et al.*, 2007; Bolliger *et al.*, 2012).

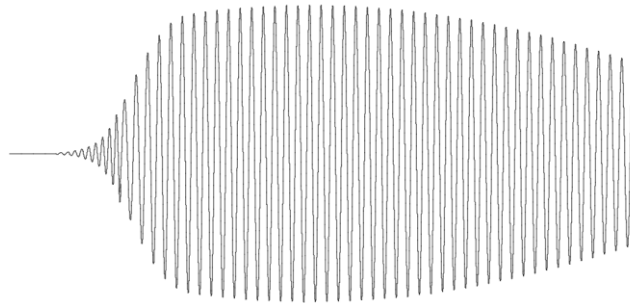
Na Figura 28 observa-se uma representação gráfica do tromboelastograma juntamente com seus parâmetros:

Figura 28: Representação gráfica do tromboelastograma.



Fonte: Retirado da literatura (Carlos e De Sousa Freitas, 2007)

Figura 29: Oscilação da sonda do tromboelastógrafo.



Fonte: Autoria própria.

3. Procedimentos Experimentais.

3.1 Síntese da zeólita Mordenita utilizando fonte de calor convencional.

Para a síntese da zeólita mordenita um gel foi preparado com a seguinte composição molar: $1\text{Al}_2\text{O}_3$: 30SiO_2 : $6\text{Na}_2\text{O}$: $780\text{H}_2\text{O}$. Para isso, 0,30 gramas de hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 11,16 gramas de água destilada sob agitação magnética. Posteriormente, 0,15 gramas de aluminato de sódio

(Riedel-de Haën) foram adicionados a solução que permaneceu sob agitação por 10 minutos até a obtenção de uma solução clara. Por fim, 1,44 gramas de sílica gel (Sigma-Aldrich, 70-230 mesh) foram acrescentados a solução, que foi mantida sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente, este processo é chamado de envelhecimento. Finalmente, o gel foi levado a um reator de teflon e tratado hidrotermicamente a 190°C por 4 dias (CH seed). Após a síntese, o produto foi lavado e recuperado por filtração com bomba a vácuo.

3.2 Síntese da zeólita Mordenita utilizando micro-ondas e semente.

Para a síntese da zeólita mordenita utilizando radiação micro-ondas, foi utilizado um gel preparado com uma composição molar de $1\text{Al}_2\text{O}_3: 30\text{SiO}_2: 6\text{Na}_2\text{O}: 780\text{H}_2\text{O}$. Para isso, 0,30 gramas de hidróxido de sódio foi dissolvido em 11,16 gramas de água destilada sob agitação magnética. Posteriormente, 0,15 gramas de aluminato de sódio foi adicionado a solução que permaneceu sob agitação por 10 minutos até a obtenção de uma solução clara. Por fim, 1,44 gramas de sílica gel foi acrescentado a solução que foi envelhecida por 1 hora sob agitação magnética temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi adotado para mais 3 géis que diferiram apenas em relação ao tempos de envelhecimentos, sendo 5 horas, 10 horas e 15 horas. Finalmente, o gel foi transferido a um reator de pirex com volume de 10mL e levado ao reator de micro-ondas (CEM-Discovery) onde permaneceu por 9 horas a 170°C, a uma potência máxima de 300W e pressão máxima de 275psi com o fluxo de ar desligado e sem agitação. Após a síntese, o produto foi lavado e recuperado por filtração com bomba a vácuo. A mesma síntese foi repetida com a temperatura de 190 °C.

3.3 Síntese da zeólita Mordenita utilizando fonte de micro-ondas e sementes.

O gel utilizado para esta síntese tem a mesma composição molar e a mesmo método de preparação das amostras anteriores. O tempo de envelhecimento para este gel foi de 1 hora sob agitação magnética a temperatura ambiente, e após este período 0,056 gramas (correspondente a 8% da massa da sílica utilizada) de semente de Mordenita sintetizada hidrotermicamente foram adicionadas ao gel que permaneceu sob agitação por 30 minutos. O gel foi transferido ao reator de pirex com volume de 10mL e levado ao reator de micro-ondas onde permaneceu por 5 horas (MH_1) a 170°C, a uma potência máxima de 300W e pressão máxima de 275psi com o fluxo de ar desligado e sem agitação. Após a síntese, o produto foi lavado e recuperado por filtração com bomba a vácuo. Da mesma forma foram feitas mais 2 sínteses com tempos de 7 (MH_2) e 9 horas (MH_3).

3.4 Caracterização da zeólita Mordenita por técnicas físico-químicas.

Os padrões de DRX das partículas sintetizadas foram coletados no Lacet-Laboratory for Clean Energy Technology – IBILCE/UNESP utilizando um difratômetro Rigaku Miniflex II X-Ray Diffractometer com uma fonte de ânodo rotativo com uma placa plana na geometria de Bragg-Brentano, operando com radiação Cu-K α (comprimento de onda = 1,5418 Å) a 50 kV e 100 mA, e equipado com um monocromador de grafite. Os padrões de difração em pó foram registrados na faixa de $2\theta = 5^\circ - 80^\circ$ com um passo de digitalização de $0,02^\circ$ e uma taxa de 10 s/step. A indexação dos índices de Miller e a determinação da rede primitiva foi obtida utilizando o software Threor90.

Os experimentos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizados no laboratório de caracterização estrutural do departamento de engenharia de materiais (LCE-DEMa/UFSCar). As amostras foram cobertas com uma camada fina de ouro e as imagens foram coletadas utilizando um instrumento FEI Magellan 400 L, operando com feixe de elétrons regulável para tensões de 5 a 25 kV.

Os experimentos de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (MET) também foram realizados no LCE-DEMa/UFSCar. A amostra foi dispersa em água, seca a vácuo e depositada em uma grade de carbono. O padrão de difração de elétrons foi obtido utilizando um instrumento FEI Tecnai G² F20 HRTEM operando com tensão de 200kV.

As medidas de potencial zeta foram realizadas no laboratório de estudos em peptídeos (LEPe- IBILCE/UNESP). Para a realização das medidas, 2mg de zeolita foi dispersa em uma solução de nitrato de cálcio 0,1M e o pH da solução foi ajustado com soluções de NaOH e HCl.

As medidas de adsorção, realizadas no centro de revestimentos cerâmicos (CRC), foram previamente secas em estufas por 24 horas a 100°C e submetidas a um pré- tratamento a 150°C por 3 h sob vácuo para retirar toda umidade e espécies adsorvidas da superfície do material. Em seguida, as amostras foram caracterizadas através de isotermas de adsorção de N₂ que foram registradas na temperatura do nitrogênio líquido utilizando o equipamento Nova 2000 e da Quantachrome.

As análises de tromboelastografia (TEG) foram realizadas utilizando um tromboelastógrafo Haemonetics TEG 500. As medidas dos parâmetros do TEG foram realizadas utilizando sangue de voluntário fisicamente saudável e estabilizado com citrato de sódio (4%). Ao sangue citratado foi adicionado 20 uL de solução de cloreto de cálcio e 0,5 mg das zeólitas sintetizadas.

Os experimentos de microscopia de contraste de fase foi realizado depositando o sangue de voluntário fisicamente saudável junto da zeólita mordenita em uma lamina empregando o método de esfregaço. O equipamento utilizado foi o microscópio de luz Olympus BX 60 com análise de imagens computadorizada e câmera Olympus DP71.

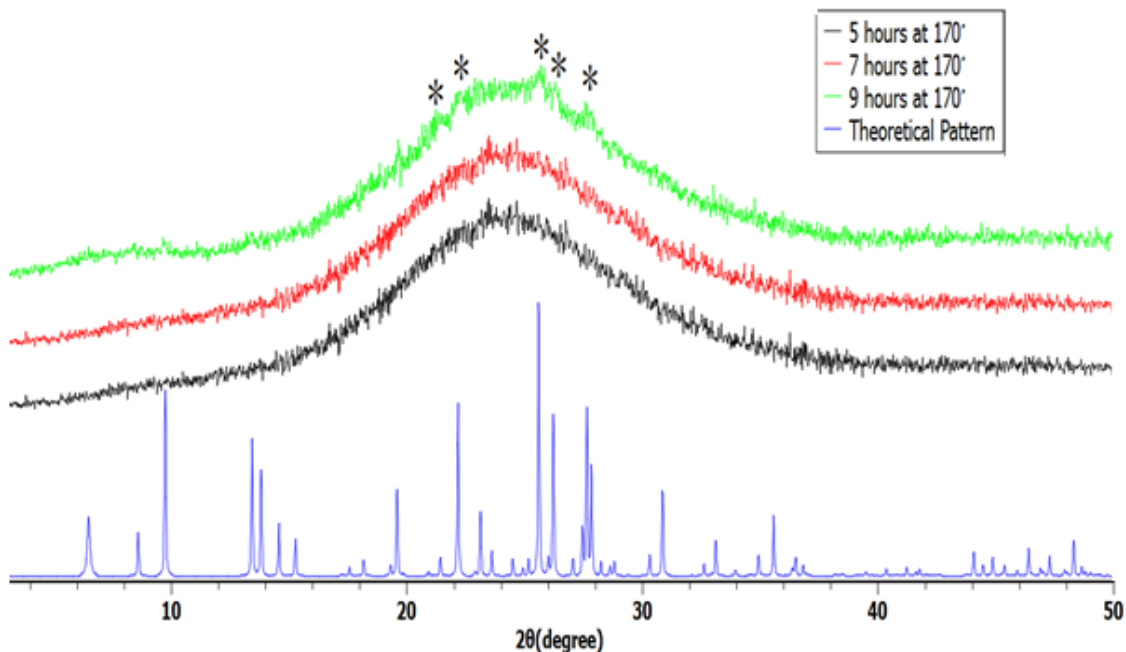
4. Resultados e discussões

4.1 Sínteses da zeólita Mordenita e análises dos padrões de difração

Foram realizadas diversas sínteses a fim de obter a zeólita Mordenita na escala nanométrica, uma vez que ela apresenta uma elevada importância em aplicações industriais e sua síntese, até o momento, era realizada por aquecimento convencional levando de dois a quatro dias.

Para contornar esse longo período de cristalização foram realizadas 3 sínteses substituindo o aquecimento convencional pela fonte de radiação de micro-ondas. Para tal fim, o gel com a composição molar $1\text{Al}_2\text{O}_3: 30\text{SiO}_2: 6\text{Na}_2\text{O}: 780\text{H}_2\text{O}$ foi envelhecido sob agitação magnética por 1 hora e em seguida foi transferido para um vessel de Pyrex e levado ao forno micro-ondas onde permaneceu à 170°C por 5, 7, 9 horas para que fosse formado o material cristalino a partir das estruturas poliméricas. Após as sínteses, a cristalinidade do material foi verificada pela difração de raios-X e o padrão de cada amostra foi comparado ao padrão teórico IZA da zeólita Mordenita (Figura 30).

Figura 30: Padrões de difração das amostras de Mordenita sintetizadas sob radiação de micro-ondas e sem adição de sementes com tempos de sínteses variados.



Fonte: Autoria própria.

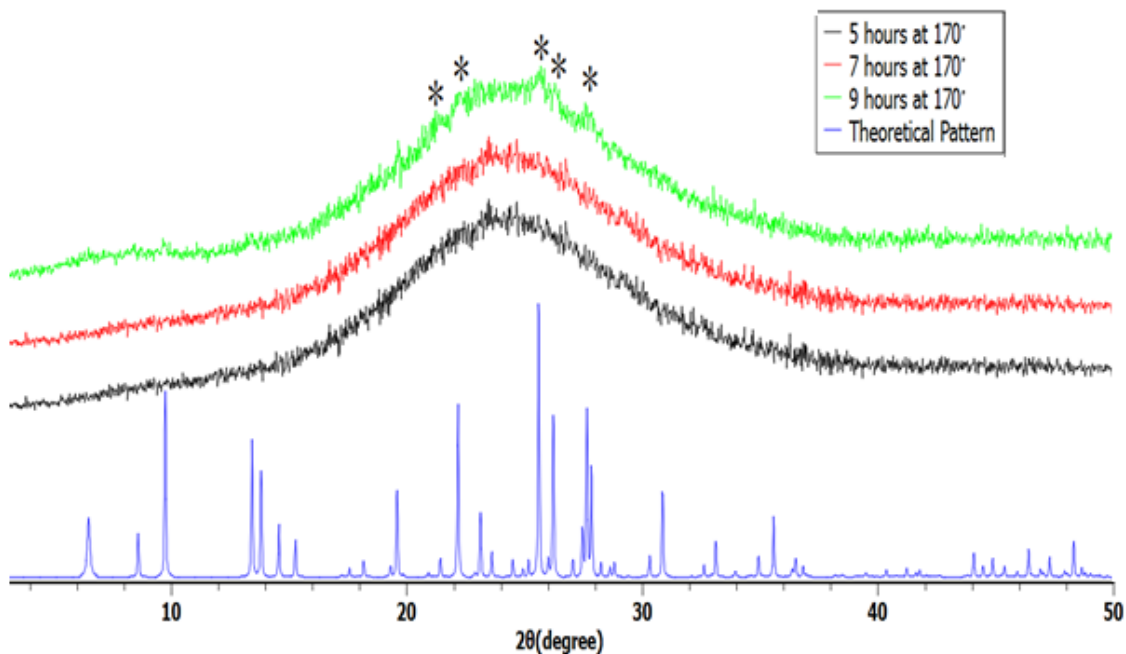
Os padrões de difrações revelam que o material sintetizado durante 5 e 7 horas não apresentaram nenhuma cristalinidade uma vez que não foi observado picos de interferências construtivas das ondas de raios-X que representam a periodicidade do material. Por outro lado quando é analisado o padrão de difração do material sintetizado à 9 horas, alguns picos entre 20° à 30° começaram a surgir com baixa intensidade. O surgimento de alguns picos referentes a Mordenita sugeriu que se o gel de síntese fosse exposto à radiação de micro-ondas por um tempo superior a 9 horas ocorreria a formação do material cristalino, entretanto nem o equipamento que gera micro-ondas nem o vessel utilizado foram projetados para trabalhar em um tempo superior a 9 horas.

Ainda com o objetivo de diminuir o tempo de síntese, a temperatura de cristalização foi alterada para 190°C uma vez que a temperatura é um parâmetro

possível de modificar e de fundamental importância para o sistema. Entretanto a elevação da temperatura provocou a degradação do vessel de pyrex em apenas 5 horas de síntese.

Tendo em vista a limitação de altas temperaturas de síntese, uma alternativa foi alterar o tempo de envelhecimento do gel pois acreditava-se que com um tempo maior de envelhecimento não seria necessário longos tempos de exposição à radiação para a cristalização do material. Sendo assim o tempo de envelhecimento foi aumentado de 1 hora para 5 horas, 10 horas e 15 horas. A temperatura de cristalização foi de 170°C e o tempo, novamente, variou entre 5 e 9 horas.

Figura 31: Padrões de difração das amostras de Mordenita sintetizadas sob radiação de micro-ondas e sem adição de sementes com tempos de envelhecimento e sínteses variados.



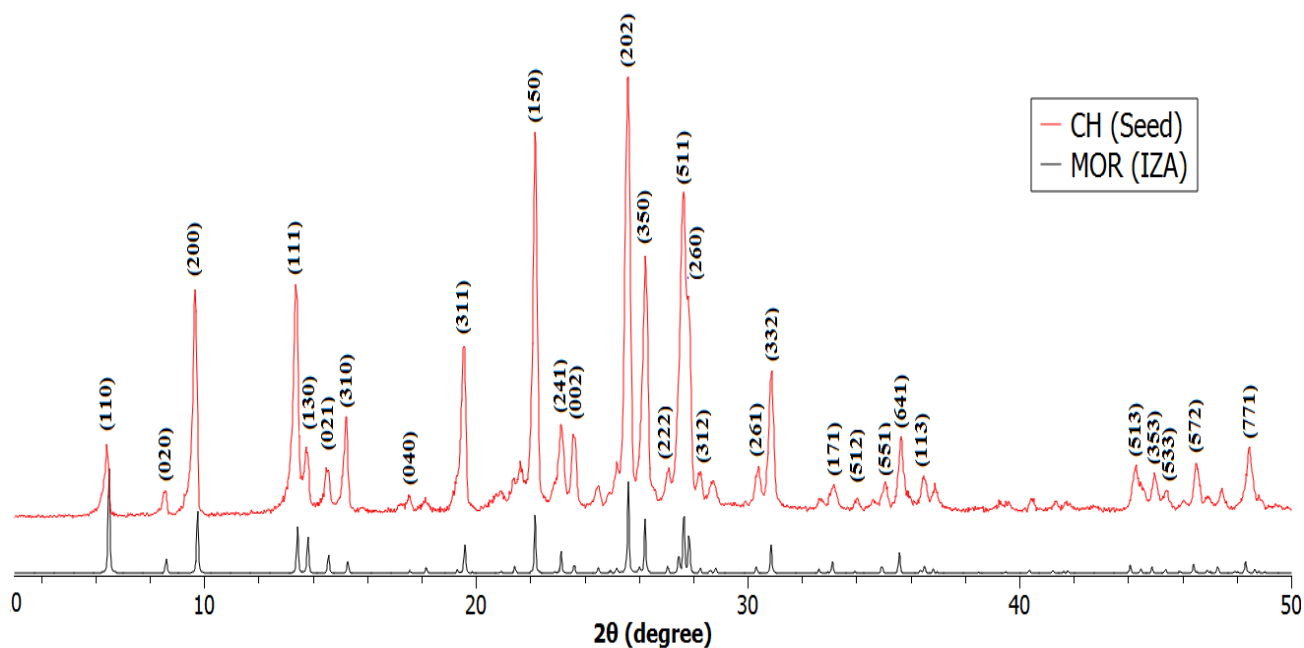
Fonte: Autoria própria.

Os padrões de difração da Figura 31 mostram que o aumento no tempo de envelhecimento não foi satisfatório, ou seja, o tempo de 1 hora de envelhecimento é suficiente para a formação das espécies poliméricas necessárias para a cristalização. Após as análises dos resultados obtidos foi necessário encontrar uma alternativa para a síntese já que a modificação dos parâmetros possíveis de serem alterados não resultou na síntese dos nano cristais de Mordenita.

Hincapie e colaboradores (Hincapie *et al.*, 2004) mostrou, utilizando o aquecimento convencional, que a presença da zeólita Mordenita no gel de síntese era uma espécie de superfície que facilitava a nucleação de novas zeólitas Mordenita e favorecia a formação e orientações dos planos cristalinos das nano zeólitas, reduzindo assim o tempo de síntese. Estas zeólitas utilizadas como superfície foram chamadas de sementes. Neste contexto, fez-se imprescindível a introdução e teste dessas sementes de Mordenita no gel de síntese sob radiação de micro-ondas.

Primeiramente foram sintetizadas as sementes de Mordenita pelo método de aquecimento convencional previamente descrito por Hincapie e colaboradores (Hincapie *et al.*, 2004). A Figura 32 mostra o padrão de difração juntamente com os índices de Miller indexados pelo software Threor90 da amostra sintetizada por aquecimento convencional, onde foi mantida a 190°C por 3 dias.

Figura 32: Padrão de difração da zeólita sintetizada sob aquecimento convencional.



Fonte: Autoria própria.

Comparando o padrão de difração obtido experimentalmente (vermelho) e o padrão teórico (preto) pode-se verificar que a zeólita sintetizada possui os picos referentes as direções de planos cristalinos característicos da zeólita Mordenita. Com este padrão de difração e utilizando a equação de Bragg (equação 1) com $\lambda=1,54\text{\AA}$ e $n=1$ foi possível calcular as distancias entre os dois primeiros planos cristalinos paralelos de cada direção (Tabela 2).

Tabela 2: Dados de 2θ e distância entre planos cristalinos da zeólita Mordenita sintetizada com aquecimento convencional.

2θ (°)	d (Å)
6.47	13.64
8.59	10.28
9.71	9.09
13.41	6.59
13.82	6.39
14.55	6.08
15.23	5.81
17.28	5.12
19.58	4.52
22.23	3.99
23.21	3.82
23.66	3.75
25.62	3.47
26.28	3.38
27.68	3.22
30.40	2.93
30.89	2.89
33.25	2.69
35.13	2.55
35.70	2.51
36.46	2.46
44.35	2.04
45.04	2.01
46.53	1.95
48.44	1.87

Fonte: Autoria própria.

Com os dados 2θ da tabela, os índices de Miller do difratograma e o software threor90 foi possível obter os parâmetros de célula unitária da zeólita Mordenita (Tabela 3).

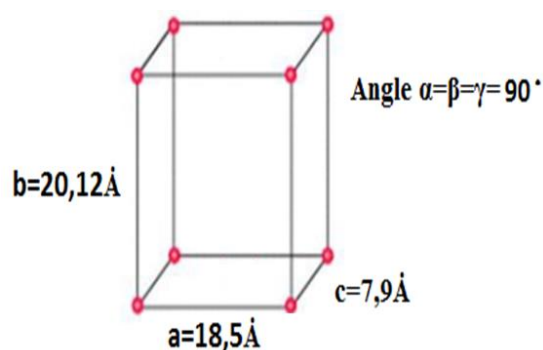
Tabela 3: Parâmetros de célula unitária da semente Mordenita.

α (°)	90,0
β (°)	90,0
γ (°)	90,0
a (Å)	18,5
b (Å)	20,12
c (Å)	7,9
Volume (Å ³)	2940,54

Fonte: Autoria própria

A Tabela 3 fornece os dados como sendo $\alpha=\beta=\gamma$ e $a\neq b\neq c$, a rede de Bravais possível para esses parâmetros é a ortorrômbica e com os dados de a, b, c ilustrados na Figura 33. A rede de Bravais encontrado para a Mordenita neste trabalho é a mesma que a rede encontrada pela primeira vez por Meier, W. (Meier W, 1961), o que difere são os tamanhos das arestas a, b e c da rede.

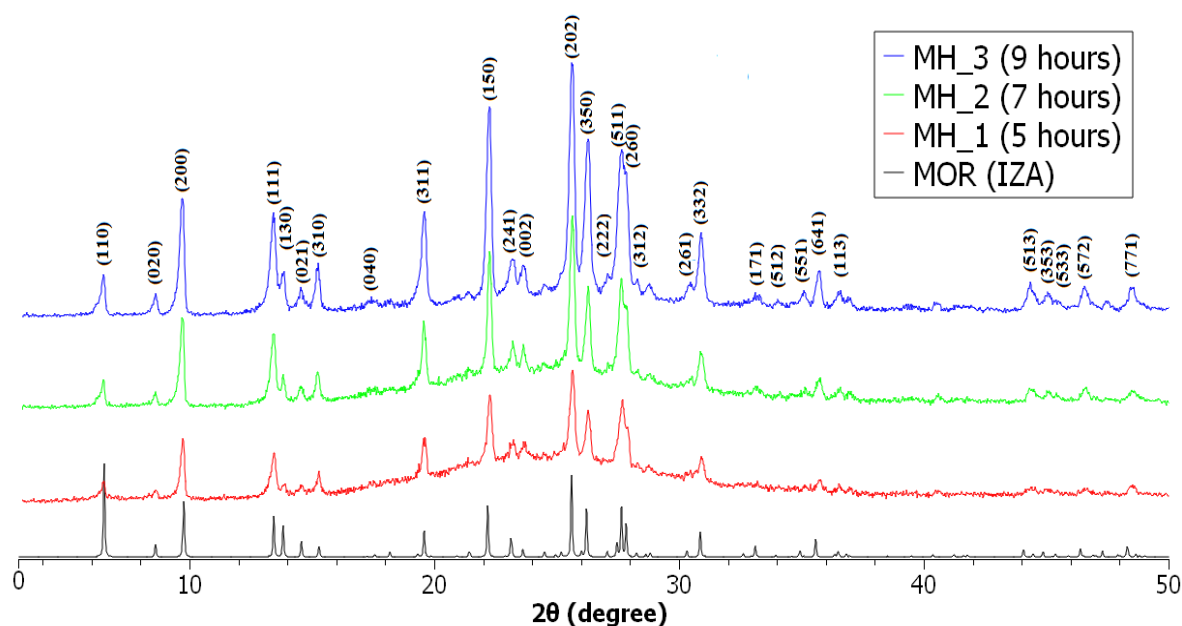
Figura 33: Modelo de uma Rede ortorrômbica.



Fonte: Autoria própria.

Após verificado a síntese da semente, foi realizado a síntese da zeólita Mordenita sob radiação de micro-ondas à 170°C por 5, 7 e 9 horas com adição da zeólita (semente) sintetizada previamente por aquecimento convencional. A Figura 34 mostra os padrões de difração obtidos para cada tempo diferente de síntese.

Figura 34: Padrões de difração para as zeólitas sintetizadas sob radiação de micro-ondas.



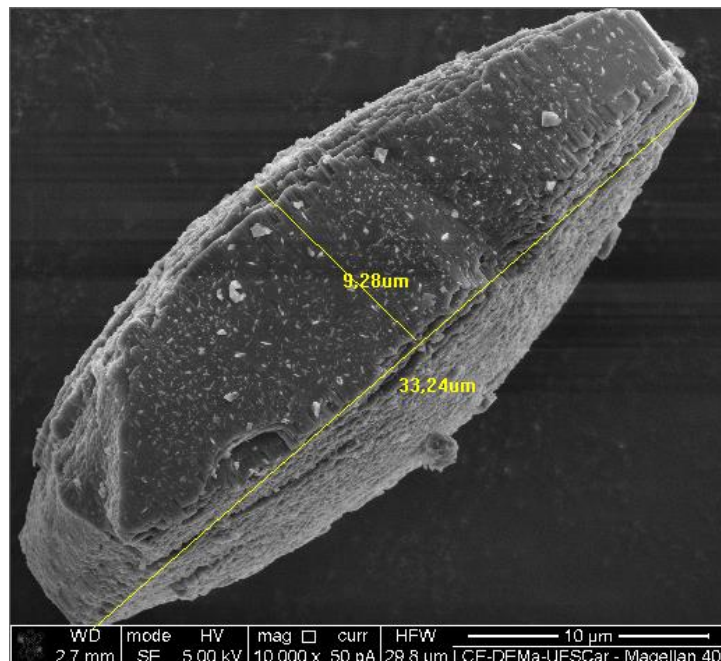
Fonte: Autoria própria.

Os padrões de difrações da Figura 34 revelam que a Mordenita foi sintetizada com apenas 5 horas sob a radiação de micro-ondas e que após esse tempo os cristais de Mordenita tiveram seus picos de difrações cada vez mais estreitos e intensos. Segundo a equação de Scherrer, quanto menor o valor de β (largura à meia altura do pico mais intenso) maior será o diâmetro da zeólita. Portanto quanto maior o tempo de exposição do gel à radiação de micro-ondas, maior é o tamanho dos cristais. Esses resultados foram reafirmados pelos resultados da microscopia eletrônica que são discutidos na próxima seção. Da mesma forma, os padrões de difração da Figura 34 tiveram os índices de Miller indexados e por apresentarem 2θ aproximadamente nas mesmas posições, as distancias interplanares e a célula unitária possuíram as mesmas características da semente (Tabela 2 e Figura 33).

4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão de alta resolução (MET) da zeólita Mordenita.

Para a determinação da morfologia e tamanho dos cristais foram feitas micrografias eletrônicas originadas a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV), em que foi possível produzir imagens de alta resolução das amostras para posterior avaliação de sua morfologia. Na Figura 35 observa-se imagem da zeólita Mordenita sintetizadas pelo aquecimento convencional que foram utilizadas como semente.

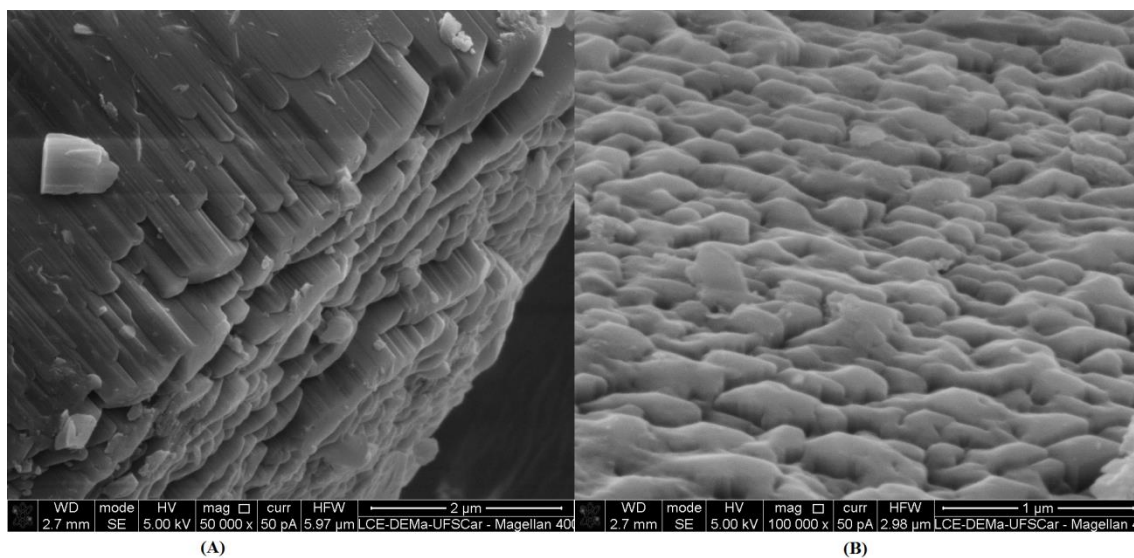
Figura 35: Micrografia da semente de Mordenita.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 35 mostra que as sementes sintetizadas possuem morfologia próxima de um disco de diâmetro de aproximadamente 30µm e espessura de 9µm. A Figura 36 mostra detalhes da rugosidade da superfície dessas zeólitas.

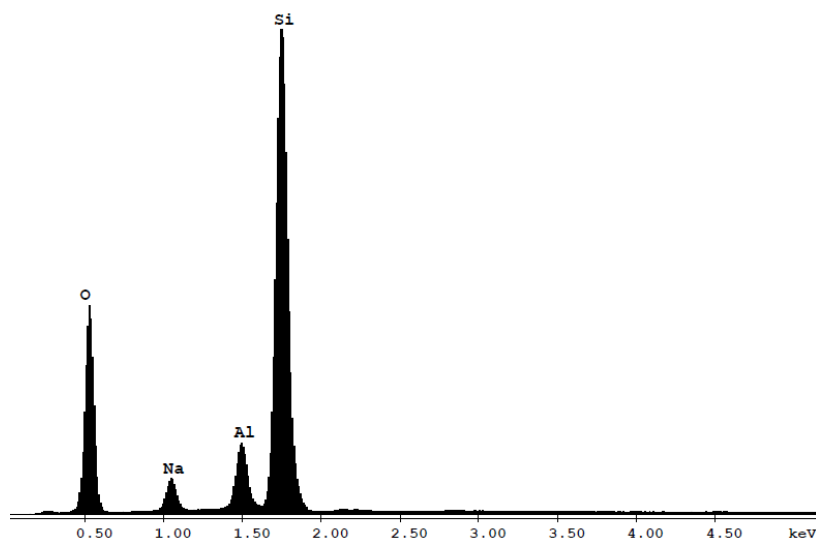
Figura 36: Ampliações da superfície da Mordenita da figura 36.



Fonte: Autoria própria.

Após verificado a morfologia através das imagens do MEV, a composição química da superfície foi averiguada através do EDX (Figura 37) que mostra picos referentes aos Raios-X liberados das transições eletrônicas referentes aos elementos oxigênio, sódio, alumínio e silício. Segundo este gráfico há uma predominância do elemento silício em relação ao elemento alumínio na superfície da zeólita concordando com a composição molar do gel de síntese, este resultado oferece indícios de que a carga residual negativa presente na superfície é baixa já que são os tetraedros de alumínio (AlO_4^-) que conferem carga a esta estrutura.

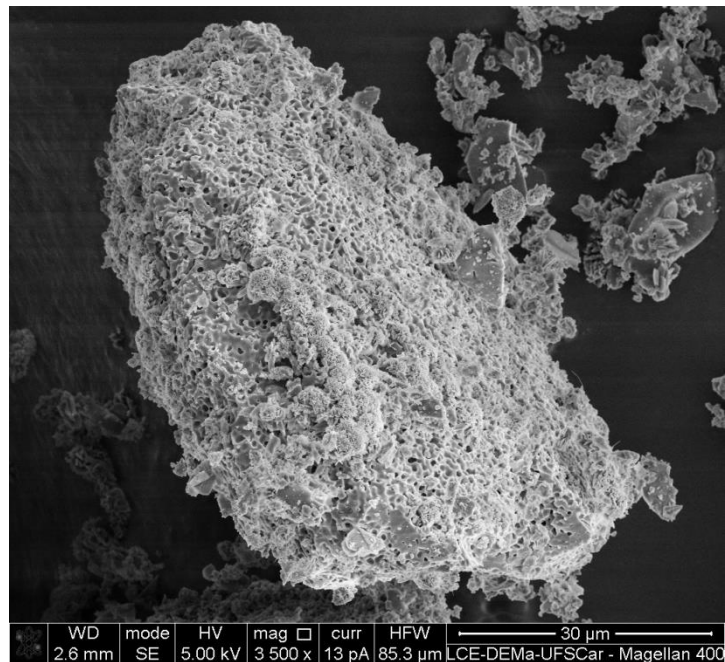
Figura 37: EDX da Semente de Mordenita.



Fonte: Autoria própria.

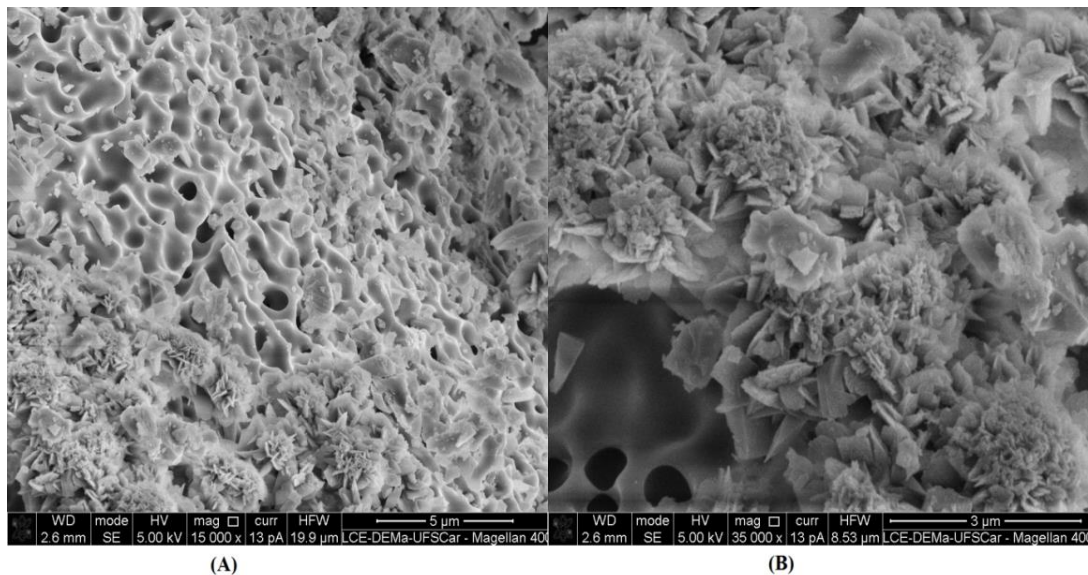
Como discutido anteriormente, o uso de sementes possibilita o crescimento de nanocristais sob sua superfície. A micrografia da síntese utilizando sementes e radiação micro-ondas por 5 horas a 170°C apresentada na Figura 38 evidencia a superfície da semente onde estão sendo cristalizadas as zeólitas Mordenita na escala nanométrica. A Figura 39 (A) é uma ampliação de uma região da Figura 38 que mostra a fase inicial do processo de cristalização da zeólita enquanto que a Figura 39 (B) é a ampliação de uma região da Figura 38 que mostra em detalhes o processo de cristalização onde é visível o aglomerado de estilhas de cristais.

Figura 38: Micrografia da zeólita sintetizada com 5 horas sob radiação de micro-ondas.



Fonte: Autoria própria.

Figura 39: (A) Região de cristalização das zeólitas sobre a semente e (B) Estilhas de cristais de Mordenita.

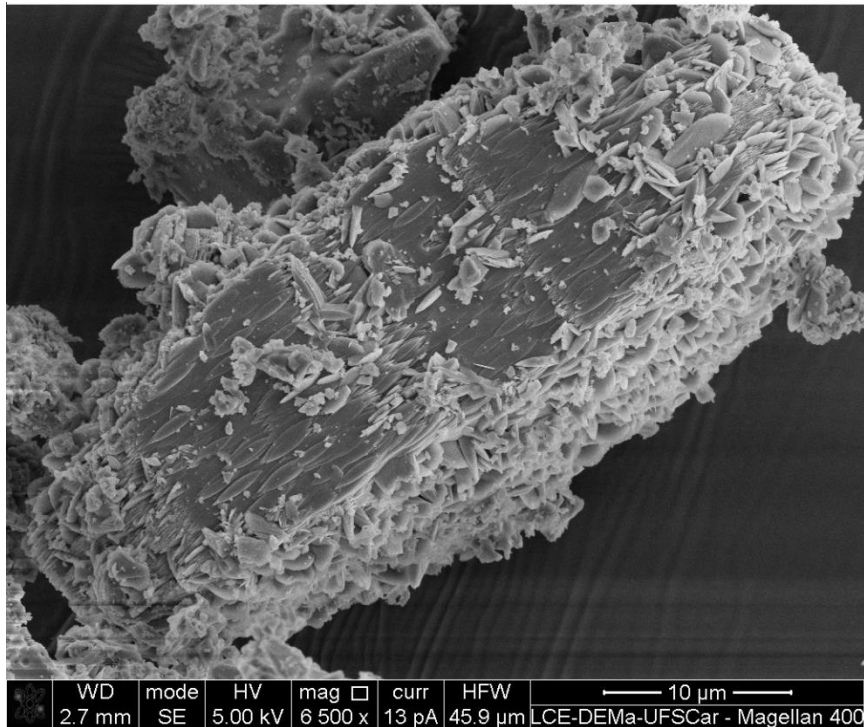


Fonte: Autoria própria.

Em relação a síntese que levou 7 horas sob radiação de micro-ondas, pode-se observar que a superfície da semente com os nano cristais de Mordenita quase na sua

morfologia final (Figura 40) e ausência daquela fase inicial de cristalização encontrada na Figura 39 (B), ou seja, o processo de cristalização esta em uma fase intermediária.

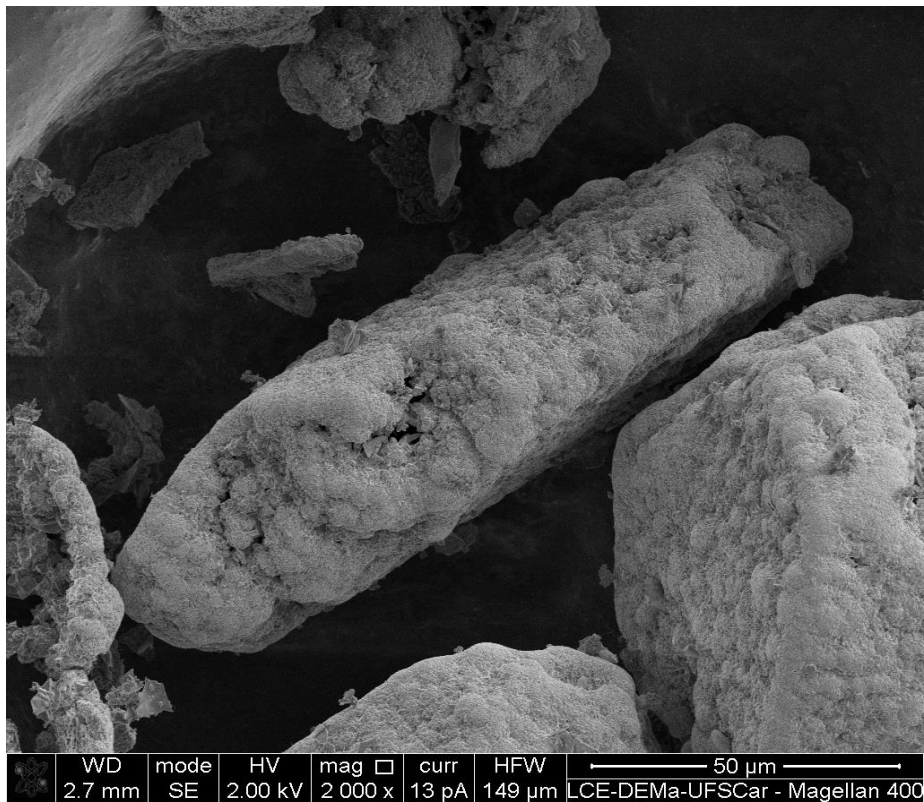
Figura 40: Micrografia de zeólitas formadas sobre a superfície da semente com 7 horas de síntese sob radiação de micro-ondas.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 41 mostra a imagem de MEV das zeólitas que foram sintetizadas à 170°C por 9 horas. Nesta micrografia verifica-se que os cristais de Mordenita crescidos sob radiação de micro-ondas recobrem e permanecem aderidos à semente, fenômeno este, que não foi verificado por Hincapie e colaboradores (Hincapie *et al.*, 2004) quando foram utilizados sementes de Mordenita para síntese destas zeólitas com aquecimento convencional

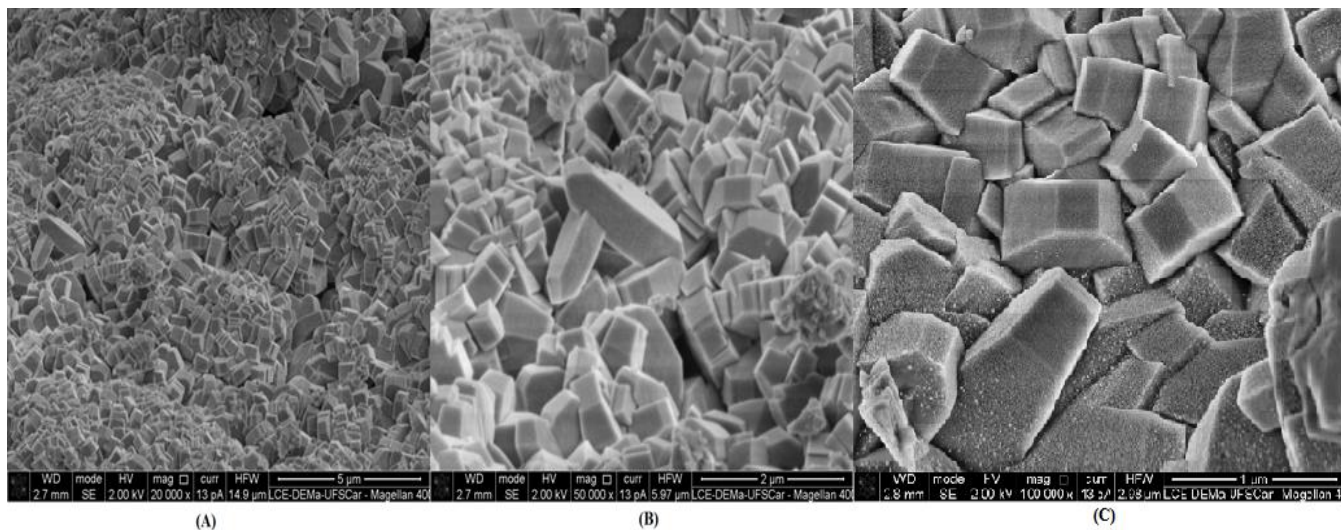
Figura 41: Micrografia de zeólitas formadas sobre a superfície da semente com 9 horas de síntese sob radiação de micro-ondas.



Fonte: Autoria própria.

Para uma visualização melhor da superfície da semente, a imagem foi ampliada gerando as Figura 42 (A), (B) e (C) que permitem a observação de detalhes da morfologia dos nano cristais de Mordenita. Observa-se nesta figura que os nano cristais de Mordenita possuem a mesma morfologia da semente, ou seja, possuem morfologia próxima de um disco.

Figura 42: Ampliações da micrografia da Figura 41 com magnitudes de ampliações de (A) 20000X (B) 50000X (C)100000X.

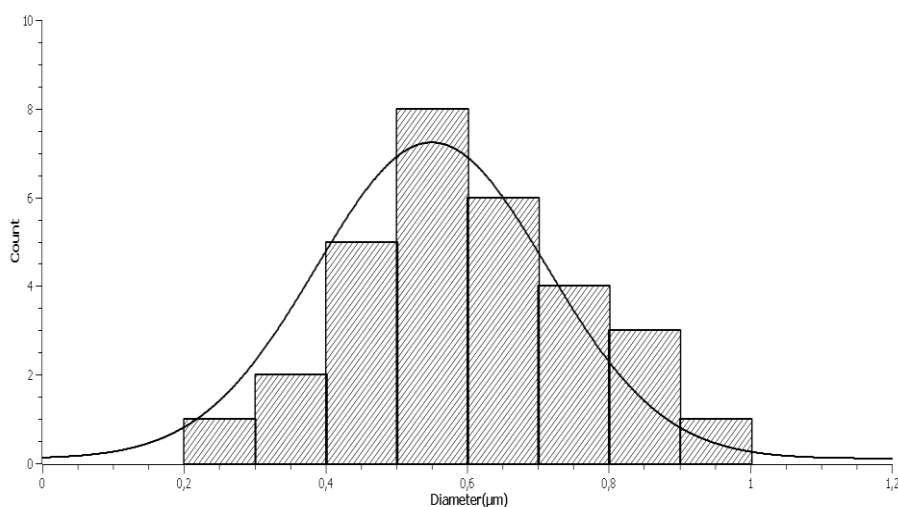


Fonte: Autoria própria.

Para obter mais detalhes sobre a distribuição de tamanhos das nanozeólitas Mordenita foi utilizado o software ImageJ juntamente com a Figura 42B para obter uma distribuição de tamanhos. De acordo com a distribuição da Figura 43 o diâmetro dos discos de Mordenita sintetizadas em 9 horas sob radiação de micro-ondas com adição de sementes está localizada na faixa entre 500-600nm. O tamanho do material obtido é aproximadamente 18 vezes menor que o obtido por (Li *et al.*, 2011) que utilizou em sua síntese radiação de micro-ondas sem adição de sementes e obteve zeólitas de tamanho de aproximadamente 9 μm .

Essa redução na escala dos cristais torna-se interessante no âmbito da aplicação deste material como agente hemostático coagulante, pois a razão entre os átomos externos e internos aumenta ao passo que a dimensão do cristal reduz e em virtude ao aumento desta razão a área superficial do conjunto dos cristais torna-se maior como será mostrado nos resultados de BET. Em consequência dessas mudanças físico-químicas, quando o material nanométrico é colocado em contato com o sangue adsorve mais moléculas de água e concentra as proteínas e fatores coagulantes.

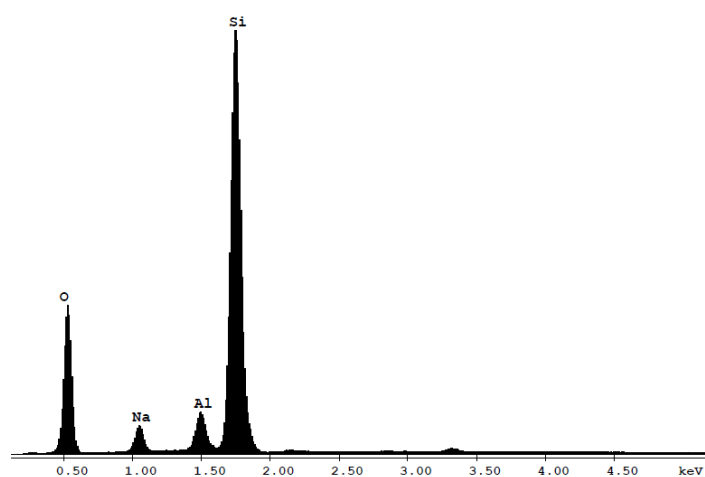
Figura 43: Distribuição de tamanhos da zeólita Mordenita sintetizada por 9 horas sob radiação de micro-ondas.



Fonte: Autoria própria.

A análise da composição química dessa amostra foi verificada através da técnica EDX (Figura 44) que mostrou que a razão silício/alumínio da superfície da amostra sintetizada sob a radiação de micro-ondas foi a mesma da semente sintetizada por aquecimento convencional.

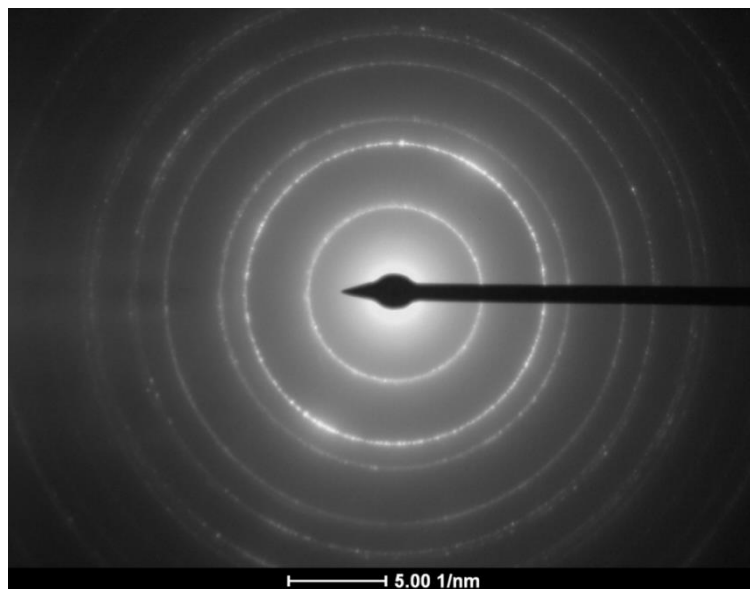
Figura 44: EDX da zeólita sintetizada com 9 horas sob radiação de micro-ondas.



Fonte: Autoria própria.

Após a caracterização do material pelo MEV, a amostra foi submetida à técnica MET para utilizar concomitantemente à técnica de Difração de raios-X e verificar o padrão cristalino da amostra. A Figura 45 é o padrão de difração de elétrons para o material policristalino onde os cristais estão orientados randomicamente.

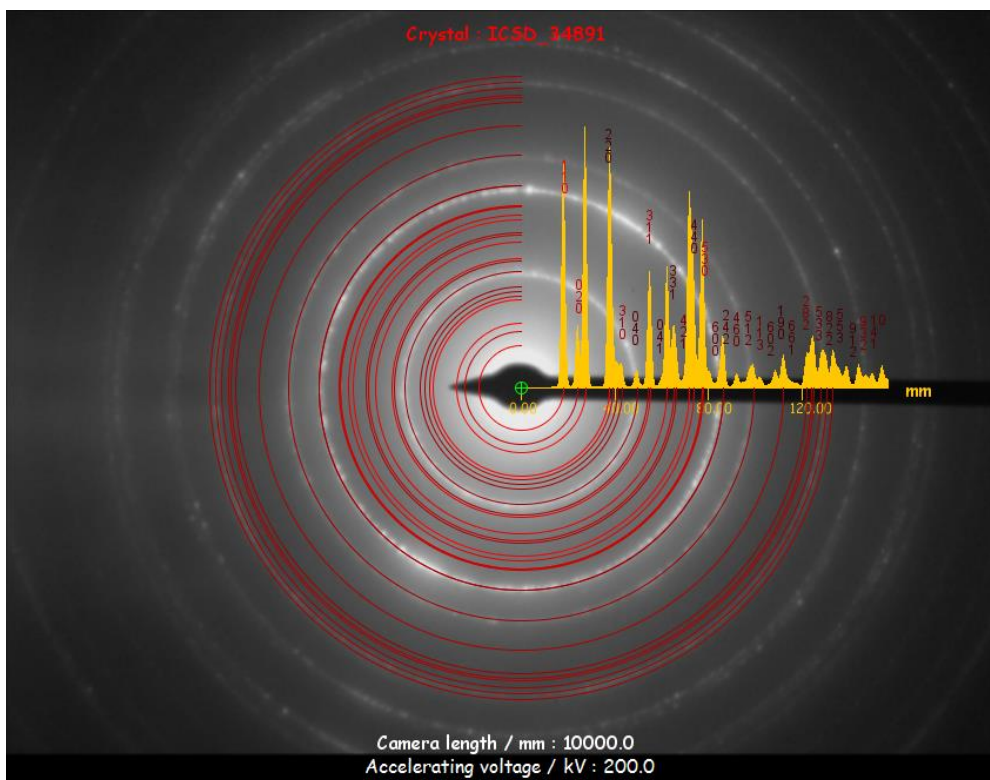
Figura 45: Padrão de difração de elétrons da zeólita sintetizada com 9 horas sob radiação de micro-ondas.



Fonte: Autoria própria.

Este padrão de difração de elétrons mostra que o material possui uma alta periodicidade e cada halo deste padrão representa a difração dos elétrons nos planos orientados em certa direção que é representado pelo seu índice de Miller. Para obter maiores detalhes este padrão foi indexado com seus índices de Miller utilizando o software JENS junto da ficha cristalográfica ICSD_34891 depositada Meier, W. (Meier W, 1961) e retirada de FIZ-karlsruhe como mostra a Figura 46.

Figura 46: Padrão de difração com suas respectivas indexações.



Fonte: Autoria própria.

Este padrão revela algumas orientações que foram privilegiadas do cristal devido a sua posição no porta amostra, os halos que tiveram a difração com maior intensidade foram referentes aos planos orientados segundo os índices de Miller (110), (040), (242), (113), (513).

4.3 Análise de BET

Para determinação da área superficial das zeólitas e tamanho dos poros, foram feitos experimentos de BET, a Tabela 4 resume as informações obtidas e a Figura 47 mostra o perfil de adsorção de moléculas do gás N_2 na superfície e nos poros das zeólitas.

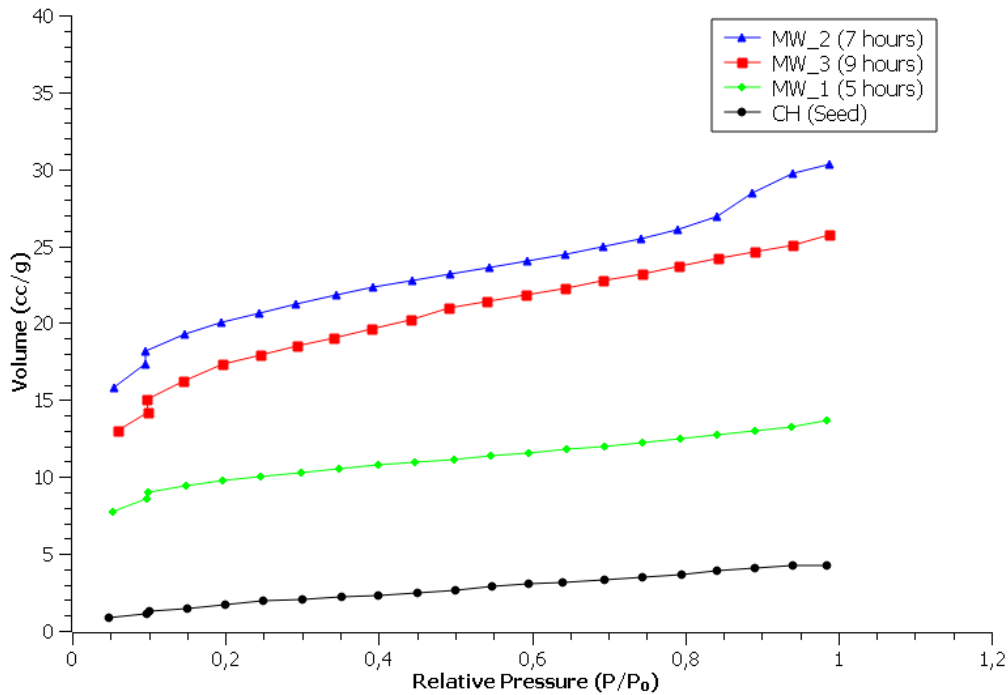
Tabela 4: Tabela com dados de BET das zeólitas Mordenita.

Sample	Surface Area (m²/g)	Pore Size (Å)
CH (Seed)	7,27	18,12
MW_1 (5 hours)	31,83	13,26
MW_2 (7 hours)	66,1	14,21
MW_3 (9 hours)	58,51	13,61

Fonte: Autorial própria.

Segundo a Tabela 4 a zeólita sintetizada pelo aquecimento convencional (CH seed) apresentou a menor área de superfície enquanto que a zeólita sintetizada sob radiação de micro-ondas com 7 horas de síntese (MW_2) apresentou a maior área superficial, assim sendo, esses dados mostram que quanto maior o dimensão da zeólita menor é sua área superficial. Apesar da zeólita MW_1 possuir um tempo de síntese menor e apresentar cristais menores que a MW_2, ela acabou apresentando uma área superficial menor que a zeólita sintetizada com 7 horas MW_2, isto deve-se ao fato de que 5 horas de síntese não foi tempo suficiente para que os novos cristais de Mordenita recobrissem totalmente a superfície da semente e portanto a semente influenciou na análise da área superficial.

Figura 47: Gráfico de Adsorção de moléculas de N₂ das zeólitas Mordenita.



Fonte: Autoria própria.

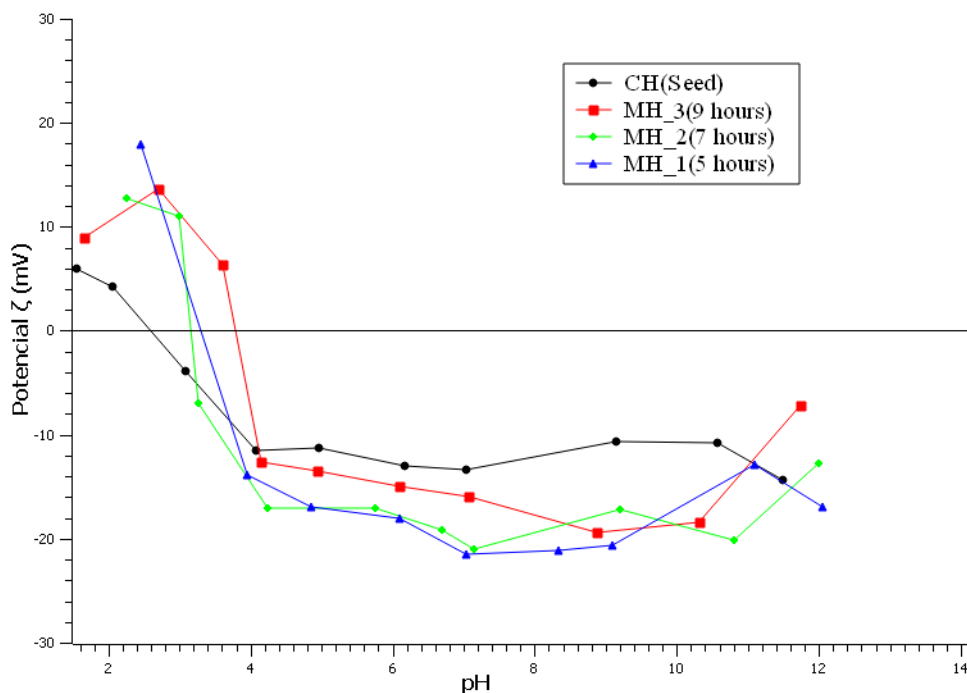
A Figura 47 mostra o perfil de adsorção das moléculas do gás N₂ nas zeólitas, segundo o gráfico a zeólita que apresentou uma maior adsorção do gás foi a sintetizada com 7 horas sob radiação de micro-ondas (MW₂), e a que apresentou uma menor adsorção foi a zeólita sintetizada por aquecimento convencional (CH seed). Esses dados revelam que quanto maior a área superficial maior a adsorção e quanto menor a área superficial menor a adsorção.

Segundo os dados de BET obtidos, pode-se dizer que a zeólita MW₂ terá uma influencia maior no processo de coagulação no que se diz respeito a adsorção de um número maior de moléculas de água, fazendo com que os fatores e proteínas coagulantes fiquem mais concentrados.

4.4 Análise de Potencial Zeta

Após o material ter sido caracterizado em sua forma, tamanho e composição química foi realizado o experimento de Potencial Zeta para determinação da carga da zeólita e do pH no qual obtemos o ponto isoelétrico da zeólita. Este experimento tem como objetivo determinar a carga da zeólita e a eficiência do material em relação a sua aplicação como agente hemostático coagulante. Ostomel T. A. et. al (Ostomel *et al.*, 2006) demonstraram que óxidos ácidos com ponto isoelétrico abaixo do pH fisiológico do sangue (pH=7,4) e inicialmente com carga negativa são bons materiais coagulantes, pois a carga negativa é um sinalizador químico para inicialização da via intrínseca da cascata de coagulação. O experimento foi realizado utilizando os cristais de zeólita Mordenita e solução salina $\text{Ca}(\text{NO})_2$ 0,1M.

Figura 48: Potencial Zeta das zeólitas Mordenita.



Fonte: Autoria própria.

O gráfico da Figura 48 mostra que inicialmente em pH=7,4, os materiais possuem potencial elétrico negativo, ou seja, o material possui carga negativa. Os

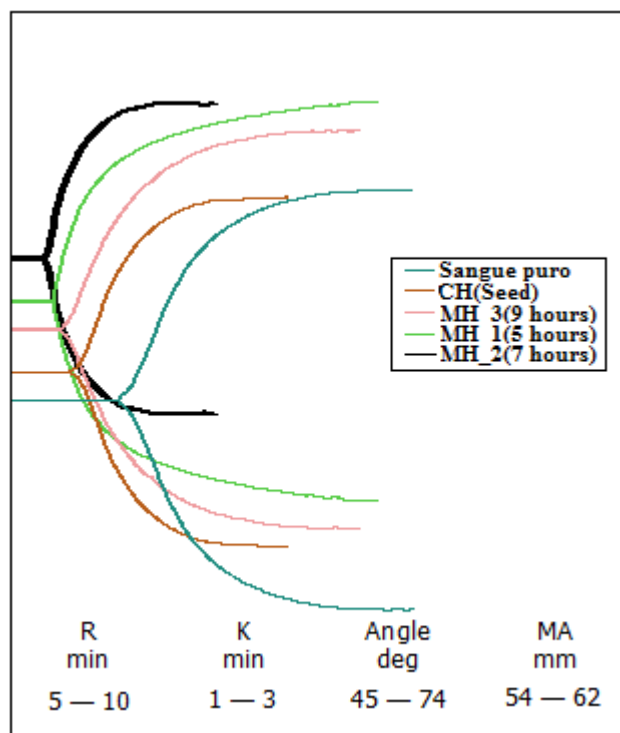
resultados obtidos pelos experimentos de potencial zeta mostraram que o ponto isoelétrico dos materiais estão na faixa de pH entre o pH 2 ao pH 4, com isso, pode-se concluir que esses materiais terão ação de agentes hemostáticos coagulantes, pois o ponto isoelétrico esta na faixa de pH em que Ostomel T. A. e colaboradores (Ostomel *et al.*, 2006) classificou como sendo a faixa de materiais coagulantes.

4.5 Estudos tromboelastográficos e micrografias de contraste de fase das zeólitas Mordenita.

Tendo em vista que os resultados dos experimentos de potencial zeta e BET mostraram que os materiais apresentam características importantes que podem fazer com que o processo de coagulação ocorra mais rapidamente, foi realizado o experimento de tromboelastografia a fim de obter os parâmetros que avaliam o potencial dos materiais como agentes hemostáticos.

Quando as zeólitas Mordenita, independente de sua escala e método de síntese, foram adicionadas ao sangue o parâmetro R diminuiu quando comparado ao sangue puro. Como vemos na Figura 50 as curvas em preto, verde, rosa e marrom, que são resultados do TEG de amostras com adição de zeólitas, aumentam a amplitude de oscilação antes da curva em azul (sangue puro).

Figura 49: Tromboelastogramas de amostras de sangue com adição de zeólitas (curvas em preto, verde, rosa e marrom) e sem adição do material zeolítico (curva em azul).



Fonte: Autoria própria.

Como mostra a Tabela 5 o parâmetro R do sangue puro (sem adição de zeólitas) foi de 9,8 minutos e o maior decréscimo neste parâmetro foi obtido quando a zeólita MH_2 foi utilizada. Ao observar novamente os dados de potencial zeta das zeólitas sintetizadas (Figura 48), nota-se que em pH 7,4, pH do sangue humano, as zeólitas MH_2 e MH_1 possuem aproximadamente o mesmo valor de potencial zeta, o que significa que ambas as zeólitas possuem a mesma carga superficial em pH sanguíneo. Considerando apenas o efeito da carga, o esperado para o valor de R quando utilizado a zeólita MH_1 era um tempo próximo do obtido quando utilizado a zeólita MH_2, uma vez que ambas possuem a mesma carga superficial. Porém não é isso que observa-se no tromboelastograma. Essa variação nos resultados do parâmetro R está relacionada com a diferença entre as áreas superficiais das zeólitas MH_2 e MH_1, que como mostra a

Tabela 4 a zeólita MH_2 possui aproximadamente o dobro da área superficial da zeólita MH_1. Como consequência, a zeólita MH_2 adsorve um número maior de moléculas de água o que provoca maior concentração das proteínas e fatores coagulantes, com isso o tempo de resposta para a formação do coágulo diminui.

Também observa-se na Tabela 5 que o tempo para o crescimento do coágulo (medido pelo parâmetro K) também sofreu maior alteração quando a zeólita MH_2 foi adicionada ao sangue, fazendo o tempo decrescer de 2,7 minutos para 1,4 minutos.

O parâmetro do ângulo α que esta relacionado com a taxa de geração de trombina teve um aumento de $58,6^\circ$ (sangue puro) para $73,6^\circ$ quando a zeólita MH_2 foi adicionada ao sangue mostrando que a geração de trombina foi maior quando a zeólita foi utilizada.

Tabela 5: Parâmetros R, K, ângulo α e MA dos experimentos de Tromboelastografia.

Amostra	R (Min)	K (Min)	Ângulo α ($^\circ$)	MA (mm)
Sangue Puro	9,8 \pm 0,5	2,7 \pm 0,2	58,6 \pm 1,2	59,4 \pm 2,2
CH_Seed	5,8 \pm 0,4	2,2 \pm 0,3	60,7 \pm 1,3	49,3 \pm 2,0
MH_1 (5 hours)	4,4 \pm 0,4	1,6 \pm 0,2	67,4 \pm 1,2	52,1 \pm 2,4
MH_2 (7 hours)	3,8 \pm 0,5	1,4 \pm 0,2	73,6 \pm 1,4	56,4 \pm 2,2
MH_3 (9 hours)	4,8 \pm 0,4	2,4 \pm 0,3	60,1 \pm 1,4	56,4 \pm 2,3

Fonte: Autoria própria.

Como último parâmetro tem-se a amplitude máxima (MA), este parâmetro fornece informações sobre a adesão plaquetária, ou seja, a taxa com que as plaquetas se movimentam até o local do ferimento e estão atuando no processo de coagulação, além disso, este parâmetro nos oferece informações sobre a elasticidade da rede de fibrina

formada para conter o sangramento. Quando este parâmetro é pequeno uma rede mais flexível é formada, como consequência essa rede se mantém estável mesmo quando exposta a pressão do fluxo sanguíneo. A Tabela 5 mostra que o coágulo do sangue sem adição de zeólitas apresentou MA de 59,4mm e o coágulo do sangue com material (MH_2) apresentou MA de 56,4mm.

De modo geral o material MH_2 apresentou bons resultados no processo de coagulação sanguínea quando testado *in vitro*, pois além do “glass effect” (ativação da via intrínseca por superfície carregada negativamente que ativa os fatores XII e XI além da pré-caliceína e do cininogênio de alto peso molecular (HWHK)), a zeólita apresenta alta área superficial de acordo com os dados do BET. Outro mecanismo que pode influenciar no processo de coagulação é o efeito dos íons Na^+ presentes na superfície da zeólita que podem estar atuando de maneira análoga aos íons Ca^{2+} que possuem papel reconhecido no processo de coagulação (Sunnerhagen *et al.*, 1995; Ostomel *et al.*, 2006). Acredita-se que o íon pode estar participando no processo de coagulação como cofator que desempenha um papel crítico na orientação das enzimas de coagulação sobre a superfície celular, servindo como a ponte iônica entre dois resíduos carregados negativamente, agindo de maneira a mediar a ligação dos Fatores IXa e Xa junto as plaquetas através da ligação terminal dos resíduos gamma-carboxil dos fatores nos fosfolípidos da membrana das plaquetas, como descrito por (Sunnerhagen *et al.*, 1995; Ostomel *et al.*, 2006) e (Sunnerhagen *et al.*, 1995)).

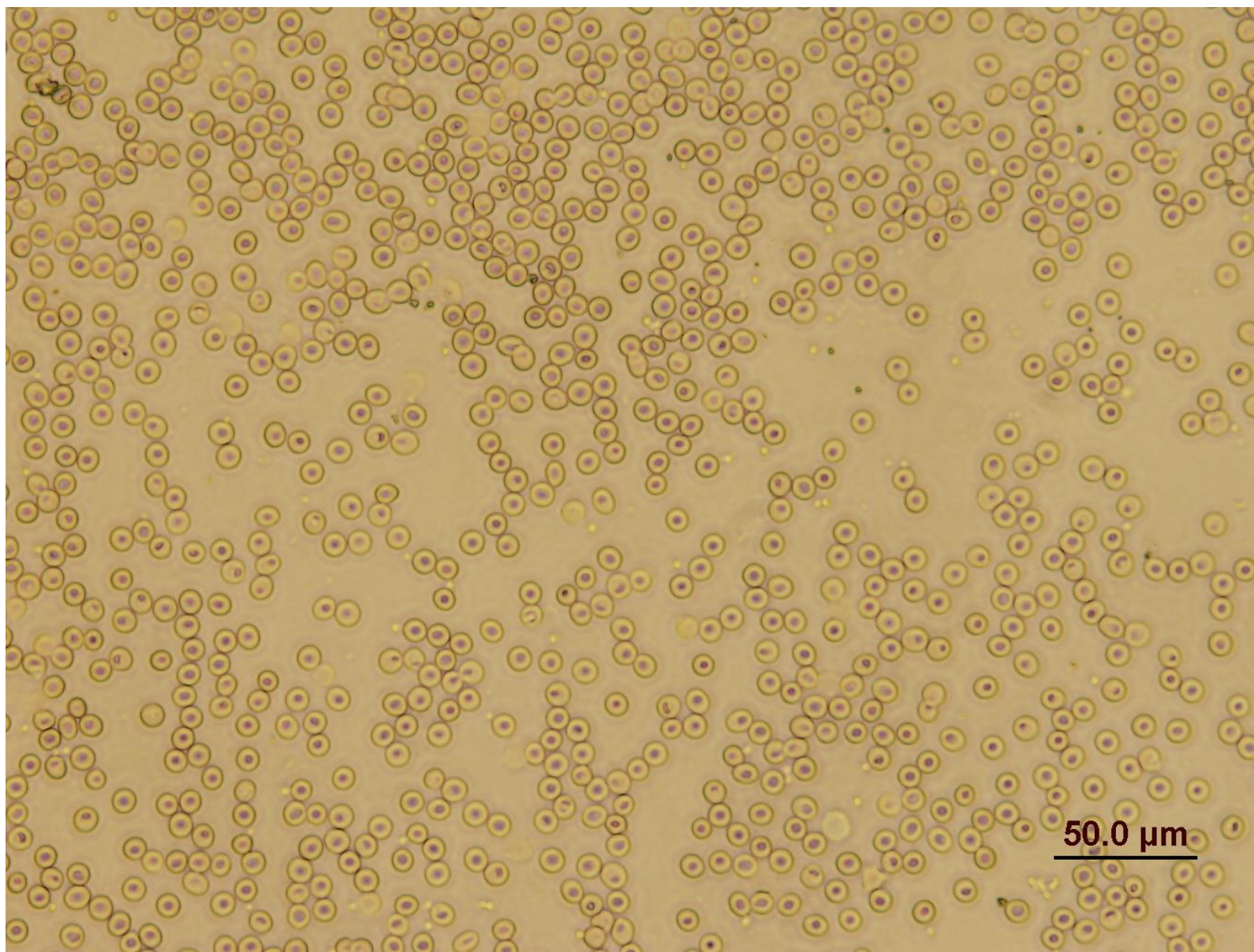
Outros sólidos inorgânicos tiveram seu potencial como agentes hemostáticos explorados, Ostomel e colaboradores (Ostomel *et al.*, 2007) estudaram o efeito da adição de partículas de óxido de silício (SiO_2) ao sangue e ao fazer o tromboelastograma obtiveram tempo de resposta inicial (parâmetro R) de 2,9 minutos, sendo que o valor de referência utilizado foi de 10,9. As partículas de SiO_2 utilizadas

pelos autores possuem ponto isoelétrico em pH 2,1 que é menor que o ponto isoelétrico da zeólita MH_2 estudada neste trabalho. Os autores também estudaram o efeito do óxido de Alumínio (Al_2O_3) que possui ponto isoelétrico em pH 7,9, este material provocou um tempo de resposta de 10,9 minutos, ou seja este material não é um agente pró-coagulante.

Em outro estudo Ostomel e colaboradores (Ostomel *et al.*, 2006) estudaram o efeito da adição da zeólita Linde Type A (LTA) ao sangue e segundo os resultados obtidos o tempo de resposta inicial foi de 2,1 minutos, neste estudo os autores não determinaram o ponto isoelétrico do material. A zeólita Faujasita (FAU) também foi estudada como agente hemostático no trabalho reportado por Laurenti e colaboradores (Laurenti *et al.*, 2017), o sangue com adição desta zeólita apresentou tempo de resposta de 2,4 minutos sendo que o ponto isoelétrico do material foi obtido em pH 3,2.

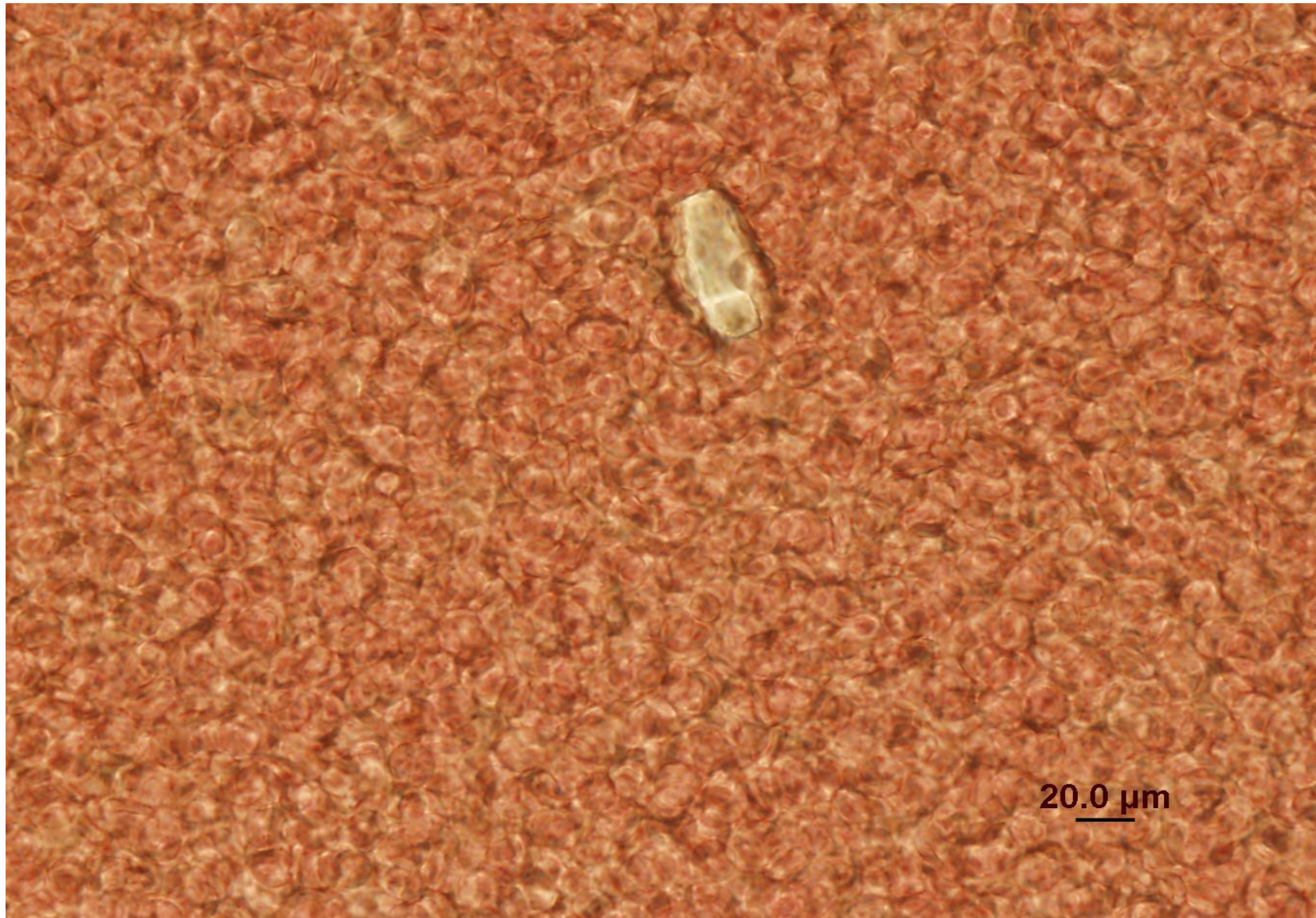
Em comparação aos estudos realizados com zeólitas que foram reportados na literatura até o momento, a zeólita mordenita MH_2, que apresentou melhores resultados neste trabalho, apresenta tempo de resposta inicial superior aos tempos descritos para as zeólitas LTA e FAU. Estas diferenças estão relacionadas com a razão silício/alumínio de cada estrutura de zeólita, com o potencial zeta de cada zeólita quando exposta ao pH sanguíneo, assim como com a área superficial que cada estrutura possui. Ainda sobre a aplicação da zeólita MH_2 como agente hemostático coagulante, foi realizado a microscopia de contraste de fase do sangue junto da zeólita em várias etapas do processo de coagulação. Devido ao tamanho grande das sementes foi possível sua visualização como mostram Figura 51 e a Figura 52. A Figura 50 mostra o sangue sem adição do material, a Figura 51 mostra o sangue junto da zeólita antes da formação de coágulo, a Figura 52 mostra a zeólita presente em um coágulo e Figura 53 mostra um coágulo formado visualizado à distância do mesmo .

Figura 50: Micrografia de contraste de fase de amostra de sangue sem adição de zeólita.



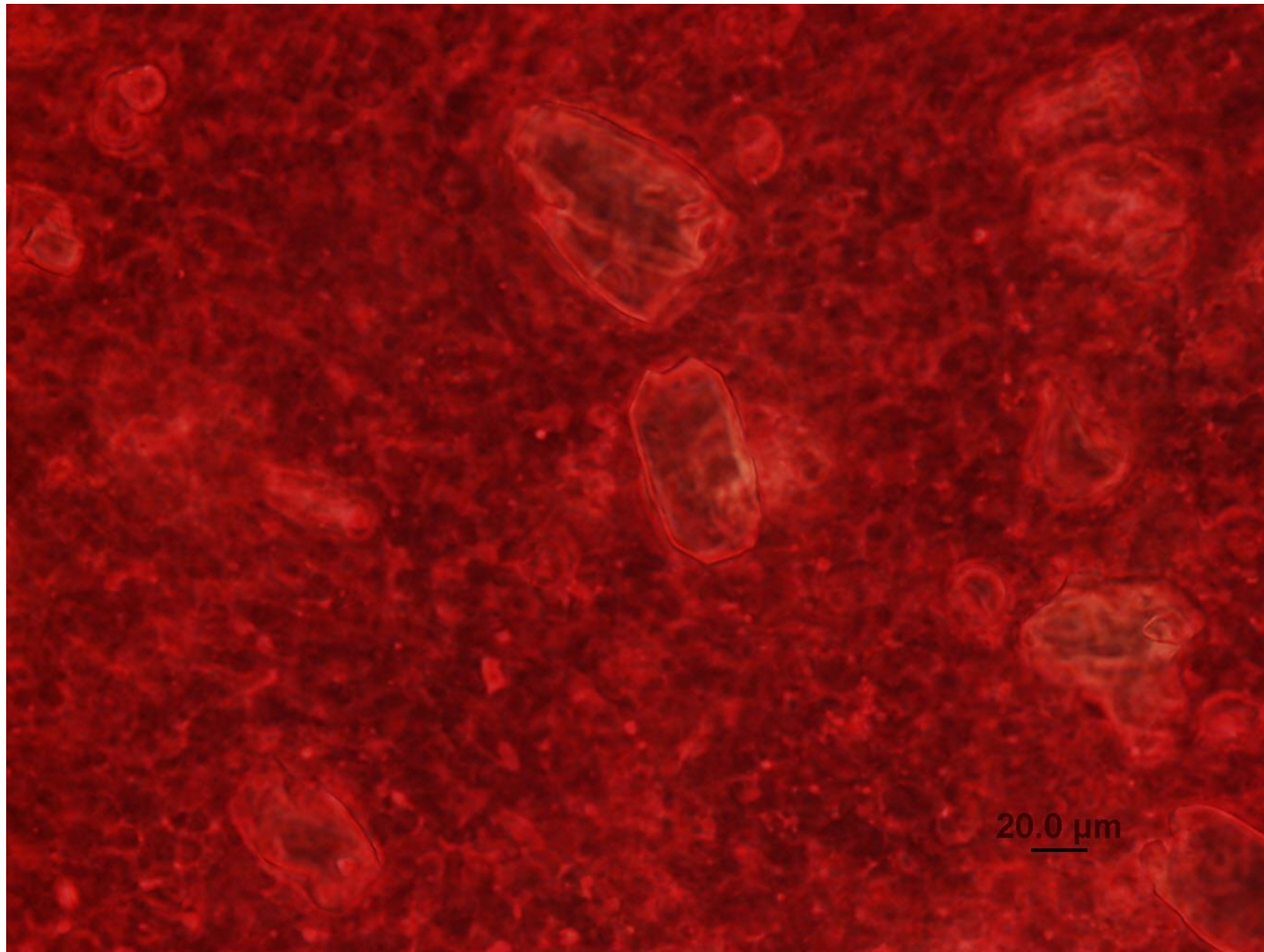
Fonte: Autoria Própria.

Figura 51: Micrografia de contraste de fase de amostra de sangue junto da zeólita antes da coagulação.



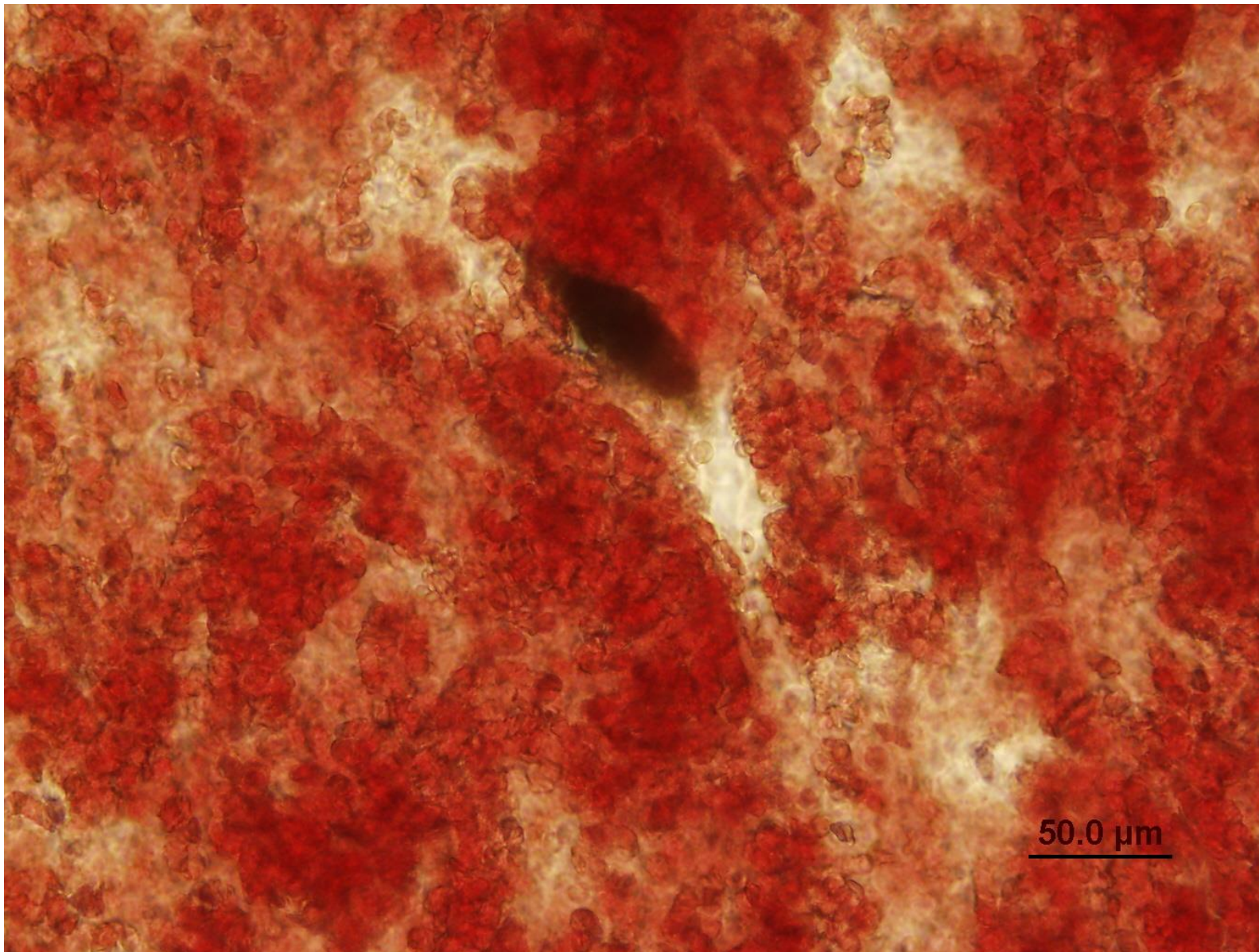
Fonte: Autoria própria.

Figura 52: Micrografia de contraste de fase do coágulo com a zeólita em seu interior.



Fonte : Autoria própria.

Figura 53: Micrografia de contraste de fase evidenciando um coágulo.



Fonte: Autoria própria.

5. Conclusões

Seguindo os objetivos propostos, os experimentos tiveram início com o desenvolvimento de um novo método de síntese para reduzir o alto tempo de cristalização necessário quando se utiliza a fonte de aquecimento convencional (4 dias). Neste contexto, o procedimento que se mostrou eficiente foi a substituição da fonte de aquecimento convencional pela radiação de micro-ondas concomitantemente à introdução de sementes de Mordenita no novo gel de síntese, com este novo método foi possível também obter zeólitas Mordenita com diâmetro 18 vezes inferior às zeólitas obtidas com radiação de micro-ondas reportado na literatura (**ver seção 4. 2**).

O reator no qual o gel de síntese estava inserido por possuir um espectro de absorvância na faixa de 300nm-340nm é invisível as micro-ondas que possuem comprimento de onda próximos de 12,25cm e devido a este fato a radiação foi completamente absorvida pelos componentes presentes no gel de síntese, tornando a entrega de energia para a cristalização deste gel mais eficiente da entrega que ocorre no aquecimento convencional (**ver seção 2. 1**). Outro mecanismo que ajudou na redução do tempo de síntese foi a introdução de sementes de Mordenita no gel de síntese, pois essas sementes foram utilizadas como uma superfície que facilitou a nucleação de novos cristais e mais que isso, estas sementes orientaram o crescimento dos planos cristalinos nas direções corretas para a obtenção da zeólita Mordenita em escala nanométrica, uma vez que a única fase cristalina resultante da síntese presente era da Mordenita.

Após proposto um diferente método de síntese para a zeólita Mordenita, o material sintetizado foi submetido as técnicas de caracterizações. A primeira técnica utilizada foi a difração de raios-X e os padrões de difrações das zeólitas Mordenita sintetizadas sob radiação de micro-ondas revelaram que para a obtenção de um material cristalino é necessário de no mínimo 5 horas de síntese à 170°C. Em seguida foram

obtidas micrografias da zeólita pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, os resultados mostraram a morfologia dos cristais como sendo discos e mostraram também que os cristais quando submetidos a um tempo de 9 horas de síntese sob radiação de micro-ondas possuíam tamanhos na faixa de 500-600nm, indicando que abaixo deste tempo os cristais possuíam dimensões menores que 500 nm, além das informações de morfologia e tamanho, o padrão de difração de elétrons para o material foi verificado e o resultado revelou um padrão de policristal.

Os resultados dos experimentos de Potencial Zeta apontaram carga residual negativa para todas as amostras em PH=7,4 e ponto isoelétrico na faixa de PH 2 a 4, esses resultados indicam que esses materiais ao entrar em contato com o sangue induziriam a ativação mais rápida da via intrínseca da cascata de coagulação. Os dados de BET mostraram que o material sintetizado com 7 horas sob radiação apresentou maior área superficial e maior adsorção de moléculas de gás N₂, indicando que quando o material MH_2 quando entrasse em contato com o sangue iria adsorver mais moléculas de água e teria um efeito maior sobre o processo de coagulação do que os outros materiais.

Por fim os materiais tiveram seus parâmetros coagulantes testados pelo TEG que mostrou que o material MH_2 teve destaque como agente coagulante assim como os experimentos de BET haviam sugerido. Segundo dados de TEG o sangue sem adição de material zeolítico teve o início de formação do coágulo com 9,8 minutos enquanto que com a adição do MH_2 esse tempo se reduziu para 3,8 minutos. Além do tempo de coagulação, o material presente no sangue propiciou uma melhoria na adesão plaquetária e geração de trombina além de deixar a rede de fibrina ligeiramente mais flexível.

6. Referências

- ADAMS, R. L.; BIRD, R. J. Review article: coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology: part 1: overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**, Richmond, v. 14, n. 5, p. 462-470, 2009.
- ALMEIDA, R. K. S. et al. Um reator fotoquímico barato e eficiente para experimentos de química. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, p. 164-167, 2014.
- ARAÚJO, M. V. D. **Síntese de agentes hemostáticos coagulantes com base em materiais zeolíticos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Paulista Julio de Mesquita Filho.
- ARNAUD, F. et al. Exothermic reaction in zeolite hemostatic dressings: QuikClot ACS and ACS+®. **Annals of Biomedical Engineering**, New York, v. 36, n. 10, p. 1708-1713, 2008.
- BECKER, R. C. Cell-based models of coagulation: a paradigm in evolution. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, New York, v. 20, n. 1, p. 65-68, 2005.
- BERTRAM, J. P. et al. Intravenous hemostat: nanotechnology to halt bleeding. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 1, n. 11, p. 11ra22, 2009.
- BOLLIGER, D.; SEEBERGER, M. D.; TANAKA, K. A. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice. **Transfusion Medicine Reviews**, Maryland Heights, v. 26, n. 1, p. 1-13, 2012.
- CARLOS, M. M. L.; DE SOUSA FREITAS, P. D. F. Estudo da cascata de coagulação sangüínea e seus valores de referência. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 1, n. 2, p. 49-55, 2007.
- CARVALHO, M. V. H. D. et al. Topical haemostatic agents and tissue adhesives. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 66-71, 2013.
- CHANDLER, W. Emergency assessment of hemostasis in the bleeding patient. **International Journal of Laboratory Hematology**, Chichester, v. 35, n. 3, p. 339-343, 2013.
- CULLITY, B. D. **Elements of X-ray diffraction**. Massachusetts: Addison-Wesley, 2001, 397-420.
- CUNDY, C. S.; COX, P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: precursors, intermediates and reaction mechanism. **Microporous and Mesoporous Materials**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 1-78, 2005.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2007.

DEVLIN, J. J. et al. Comparison of ChitoFlex®, CELOX™, and QuikClot® in control of hemorrhage. **The Journal of Emergency Medicine**, Philadelphia, v. 41, n. 3, p. 237-245, 2011.

DYER, A. **An introduction to zeolite molecular sieves**. New York, NY: John Wiley and Sons Inc, 1988.

FERREIRA, C. N. et al. A cell-based model of coagulation and its implications. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Santos, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

GALOWNIA, J.; MARTIN, J.; DAVIS, M. E. Aluminophosphate-based, microporous materials for blood clotting. **Microporous and Mesoporous Materials**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 61-63, 2006.

GALVEZ, K.; CORTES, C. Tromboelastografía: nuevos conceptos en la fisiología de la hemostasia y su correlación con la coagulopatía asociada al trauma. **Revista Colombiana de Anestesiología**, Bogotá, v. 40, n. 3, p. 224-230, 2012.

GOLDSTEIN, J. et al. **Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists**. Springer Science & Business Media, 2012.

GRIFFIN, J. H. Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1998-2002, 1978.

GRIFFITHS, D. J. **Introduction to quantum mechanics**. United Kingdom: Cambridge University Press, 2016.

GÓMEZ, F. P.; FREIRE, R. B. La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. **Revista Española de Cardiología**, Madrid, v. 60, n. 12, p. 1217-1219, 2007.

HINCAPIE, B. O. et al. Synthesis of mordenite nanocrystals. **Microporous and Mesoporous Materials**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 19-26, 2004.

KITTEL, C. **Introduction to solid state**. New York: John Wiley & Sons, 1966.

KOZEN, B. G. et al. An alternative hemostatic dressing: comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot. **Academic Emergency Medicine**, Des Plaines, v. 15, n. 1, p. 74-81, 2008.

KRÜGER, J. Blutstillung bei neurochirurgischen operationen. eine vergleichsstudie zwischen einem kollagenvlies (Lyostypt®) und einem gelatine schwämmchen (Marbagelan®). **Zentralblatt für Neurochirurgie**, [s. l.], v. 53, p. 33-36, 1992.

LAURENTI, J. B. et al. Enhanced pro-coagulant hemostatic agents based on nanometric zeolites. **Microporous and Mesoporous Materials**, Amsterdam, v. 239, p. 263-271, 2017.

- LI, G.; HOU, H.-M.; LIN, R.-S. Rapid synthesis of mordenite crystals by microwave heating. **Solid State Sciences**, Paris, v. 13, n. 3, p. 662-664, 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1293255811000033> >. Acesso em: Dezembro 2016.
- LI, J. et al. Zeolite-based hemostat QuikClot releases calcium into blood and promotes blood coagulation in vitro. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 34, n. 3, p. 367-372, 2013.
- LOKE, C.; ALI, S. S.; JOHARI, V. Pharmacology of anticoagulants. **Disease-a-Month**, Chicago, v. 58, n. 8, p. 424-430, 2012.
- MARGOLIS, J. Initiation of blood coagulation by glass and related surfaces. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 137, n. 1, p. 95, 1957.
- MCMANUS, J. et al. A case series describing thermal injury resulting from zeolite use for hemorrhage control in combat operations. **Prehospital Emergency Care**, Philadelphia, v. 11, n. 1, p. 67-71, 2007.
- MEIER W, M. The crystal structure of mordenite (ptilolite). **Zeitschrift für Kristallographie: - crystalline materials**, Berlin, v. 115, p. 439-450, 1961.
- MUMPTON, F. A. La roca magica: uses of natural zeolites in agriculture and industry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington,, v. 96, n. 7, p. 3463-3470, 1999.
- NEUFFER, M. C. et al. Hemostatic dressings for the first responder: a review. **Military Medicine**, Washington, v. 169, n. 9, p. 716-720, 2004.
- OSTOMEL, T. A. et al. Metal oxide surface charge mediated hemostasis. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, Washington, v. 23, n. 22, p. 11233-11238, 2007.
- OSTOMEL, T. A.; SHI, Q.; STUCKY, G. D. Oxide hemostatic activity. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 128, n. 26, p. 8384-8385, 2006.
- OZ, M. C.; RONDINONE, J. F.; SHARGILL, N. S. Floseal matrix. **Journal of Cardiac Surgery**, Mount Kisco, v. 18, n. 6, p. 486-493, 2003.
- PAVELIC, K.; HADZIJA, M. Medical applications of zeolites. **Handbook of Zeolite Science and Technology**. New York: Dekker, 2003, 1143-1174.
- PUSATERI, A. E. et al. Making sense of the preclinical literature on advanced hemostatic products. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, Hagerstown, v. 60, n. 3, p. 674-682, 2006.
- RHEE, P. et al. QuikClot use in trauma for hemorrhage control: case series of 103 documented uses. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, Hagerstown, v. 64, n. 4, p. 1093-1099, 2008.
- RIDDEL, J. P. et al. Theories of blood coagulation. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, Philadelphia, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2007.

- SAMUDRALA, S. Topical hemostatic agents in surgery: a surgeon's perspective. **AORN Journal**, Denver, v. 88, n. 3, p. S2-S11, 2008.
- SMART, L. E.; MOORE, E. A. **Solid State Chemistry**: an introduction. New York: CRC Press 4. ed. 2012.
- SMITH, S. A. The cell-based model of coagulation. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, San Antonio, v. 19, n. 1, p. 3-10, 2009.
- SUNNERHAGEN, M. et al. Structure of the Ca²⁺-free GLA domain sheds light on membrane binding of blood coagulation proteins. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 2, n. 6, p. 504-509, 1995.
- TOMPSETT, G. A.; CONNER, W. C.; YNGVESSON, K. S. Microwave synthesis of nanoporous materials. **ChemPhysChem**, Weinheim, v. 7, n. 2, p. 296-319, 2006.
- United States Patent. Hursey, F. Hartford, W; Dechene, F. J. P14,822,349, 25 abr. 1984, 18 abr. 1989.
- WANG, W.-C. **Electromagnetic wave theory**. New York, Wiley, 1986.
- WATT, I. M. **The principles and practice of electron microscopy**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
- WRIGHT, J. K. et al. Thermal injury resulting from application of a granular mineral hemostatic agent. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, Hagerstown, v. 57, n. 2, p. 224-230, 2004.